VERSUCHE ZUM SEROLOGISCHEN NACHWEIS VON SOJAPROTEIN IN FLEISCHWAREN.

VON

HARTMUT KRÜGER

VET. MED. DISS., BERLIN 1970

Aus dem Bundesgesundheitsamt
Max von Pettenkofer Institut
Abteilung für Veterinärmedizin, Berlin-Dahlem
Leitender Direktor u. Prof. Dr. D. Großklaus

und dem

Institut für Lebensmittelhygiene des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H.-J. Sinell

Versuche zum serologischen Nachweis von Sojaprotein in Fleischwaren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hartmut Krüger
Tierarzt aus Landsberg/Warthe

Berlin 1970
Journal-Nr. 706

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. M. Lerche

Tag der Promotion: 10. Juli 1970

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Schrifttum	2
C. Eigene Versuche	26
I. Antiserumherstellung	26
1. Versuchsabschnitt	27
Ergebnisse	30
2. Versuchsabschnitt	41
Ergebnisse	45
3. Versuchsabschnitt	47
Ergebnisse	48
II. Versuche zur Titerbestimmung mit Hilfe der indirekten Hämagglutination (i.H.)	52
Ergebnisse	57
III. Quantitative Bestimmung von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen	64
1. Modellfleischwarenherstellung	64
2. Quantitative Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Hämagglutination	68
Ergebnisse	71
3. Quantitative Untersuchungen mit Hilfe der Präzipitatmessung	83
Ergebnisse	84
4. Quantitative Untersuchungen mit Hilfe der Immunelektrophorese	93
Ergebnisse	95
D. Diskussion	101
E. Zusammenfassung	113
F. Literaturverzeichnis	114

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0069

A. Einleitung

In letzter Zeit wird in zunehmendem Maße Fremdeiweiß zur Fabrikation von Fleischerzeugnissen verwendet.

Die Verarbeitung von Fremdeiweißen in Fleischwaren ist für den Bereich der BRD durch die Fleisch-VO in ihrer Neufassung vom 25.8.1969 geregelt. Danach ist bei bestimmten Erzeugnissen der Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß (aMe), Hühnereiklar (HE) und Trockenblutplasma (TBP) unter entsprechender Kenntlichmachung und Mengenbegrenzung zugelassen.

Neben diesen - in der Fleisch-VO berücksichtigten - Fremdeiweißen existieren andere Präparate, deren Verarbeitung in jeder Form unzulässig ist; dazu gehören Weizengluten, Fischeiweiß und Sojaprotein.

Besonders das Sojaprotein ist wegen seiner technologischen Vorteile und seiner hohen biologischen Wertigkeit als möglicher Zusatzstoff propagiert worden. Da dieser Stoff in großen Mengen auf dem in- und ausländischen Markt angeboten wird, ist die Frage der Nachweisbarkeit für die Lebensmittelüberwachung besonders aktuell.

Fremdeiweiße - und vor allem das Sojaprotein - sind auf chemischem Wege nicht mit ausreichender Genauigkeit nachzuweisen. Deshalb wurden u.a. auch serologische Nachweisverfahren zur Diskussion gestellt und vergleichend überprüft. Diese Arbeiten erbrachten nicht nur widersprüchliche Bewertungen einzelner serologischer Verfahren, sie warfen darüber hinaus durch ihre Ergebnisse die grundsätzliche Frage nach der Eignung serologischer Fremdeiweißnachweis für die auf breiter Basis durchzuführende Lebensmitteluntersuchung auf.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, am Beispiel eines Fremdeiweißes, des Sojaproteins, die gemeinsame Problematik der serologischen Untersuchungen auf Fremdeiweiße in Lebensmitteln tierischer Herkunft zu umreißen und speziell diejenigen Schwierigkeiten hervorzuheben, die der routinemäßigen Anwendung der zur Zeit leistungsfähigsten Nachweismethoden im Wege stehen.

B. S c h r i f t t u m

I. Sojazusätze in Fleischerzeugnissen

Sojazusätze in Fleischerzeugnissen sind nicht erst in den letzten Jahren bekannt geworden. Sie wurden bereits während des Zweiten Weltkrieges in Deutschland durchgeführt. Der hohe ernährungsphysiologische Wert der Sojabohne ist unbestritten. Namentlich die biologische Wertigkeit des Proteinanteils der Sojabohne ist hoch einzuschätzen; sie ist mit der Wertigkeit tierischer Eiweiße vergleichbar und wird lediglich durch den gegenüber tierischem Eiweiß niedrigeren Gehalt an Methionin limitiert. Sie sichert jedoch der Sojabohne eine Spitzenstellung unter den pflanzlichen Eiweißquellen (FANGAUF (1965)).

Im Zweiten Weltkrieg waren die Sojazusätze in Fleischwaren lediglich aus der Notwendigkeit heraus entstanden, tierisches Eiweiß einzusparen und die Versorgungslage der Bevölkerung zu verbessern. Dementsprechend wurde auch auf eine aufwendige Bearbeitung des Ausgangsproduktes Sojabohne verzichtet; nach dem Verfahren von SEIBOLD (zitiert bei MIERMEISTER (1942)) wurden die Bohnen lediglich in Wasser angekeimt, gedämpft und gekuttert. Diese pastetenartige Masse wurde in Mengen von 20 % den verschiedensten Wurstwaren, wie Leberwurst, gefüllter Schinken, Bierwurst, Bockwurst, Fleischwurst und Braunschweiger zugesetzt (MIERMEISTER (1942) u. NIEMEYER (1942)). Die Sojakeimmasse enthielt nach Angaben von MIERMEISTER (1942) 69,4 % Wasser, 6,4 % Fett und 13,5 % Eiweiß. Neben dieser Form des Zusatzes wurde auch Sojamehl in Mengen bis zu 20 % zu Bockwürsten zugesetzt, wie HENNEBERG (1942) berichtet.

Die Verarbeitung von Soja und anderen vegetabilen Zusätzen in Würsten sowie deren besondere Kenntlichmachung war geregelt durch die Runderlässe des Reichsministers des Inneren vom 6.10.43, vom 19.11.43 und vom 28.6.44 (HOLTHÖFER-JUCKENACK-NÜSE (1963)). Diese Runderlässe wurden erst am

19.12.59 im § 9 der Fleisch-VO außer Kraft gesetzt.

Im Gegensatz dazu wird heute die Verwendung von Sojaeiweiß bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen aus völlig anderen Gründen propagiert. Der Zusatz von Sojaprotein wird - mit Ausnahme der Verarbeitung in Suppen, Soßen, Mayonnaisen etc. - bisher nur im Ausland durchgeführt; in Deutschland fehlt eine entsprechende gesetzliche Grundlage, wie sie für aufgeschlossenes Milcheiweiß, Trockenblutplasma und Hühnereiklar in § 4 der Fleisch-VO vom 19.12.59 in der Fassung vom 25.8.69 geschaffen worden ist. Bei der Verwendung dieser sogenannten "Fremdeiweiße", zu denen neben den eben erwähnten TBP, aME und HE auch Sojaprotein, Fischeiweiß und Weizengluten gehören, geht es den Herstellern der Fleischerzeugnisse nicht in erster Linie um den Ersatz von Eiweiß aus dem Fleisch unserer Schlachttiere, sondern vielmehr um den technologischen Effekt, den das Muskeleiweiß unserer Schlachttiere in den üblichen Rezepturen und in den modernen Herstellungsverfahren oft nicht mehr ohne fremde Hilfe erreichen kann.

Dieser technologische Effekt besteht hauptsächlich in der Fähigkeit zur Fettemulgierung und zu verstärkter Wasserbindung. Die damit verbundene Einengung des Lösungsvolumens im Wurstgut führt wiederum zur besseren Nutzung der Emulgier- und Wasserbindungsfähigkeit der Muskelproteine. Besondere Bedeutung besitzen die Fremdeiweiße für die Herstellung von hocherhitzten Fleischkonserven (KOTTER, PALITZSCH, HERRMANN (1968); BOKSCH (1965)). Das Sojaeiweiß besitzt alle diese Eigenschaften und wird darüber hinaus wegen seiner strukturverbessernden Wirkung besonders geschätzt.

Die Fremdeiweiße sind als geruchs- und geschmacksneutrale Pulver im Handel, denen die Art des Ausgangsmaterials durch die Einwirkung chemischer Reinigungs- und Aufschlußverfahren nicht mehr anzusehen ist. Sojaproteinpräparate enthalten gewöhnlich über 90 % Eiweiß und sind bis zu 70 % wasserlöslich.

II. Erste Versuche zum Nachweis von Sojazusätzen

Entsprechend der unterschiedlichen Bedeutung und Art von Sojazusätzen in Fleischerzeugnissen während des Zweiten Weltkriegs und in der Gegenwart unterscheiden sich auch die Wege, die die Lebensmittelanalytiker zur Feststellung der Art und Höhe des Zusatzes zum Schutze des Verbrauchers beschritten haben.

Die Verwendung der Sojakeimmasse nach SEIBOLD setzte die Haltbarkeit von Wurstwaren durch die Gefahr des "Sauerwerdens" erheblich herab. Auch der Genußwert der Erzeugnisse war durch eine gelbliche Verfärbung des Wurstgutes und durch leguminösen Beigeschmack beeinträchtigt (HENNEBERG (1942); NIEMEYER (1942)). Würste mit Sojazusätzen waren dementsprechend meist schon grobsinnlich von normalen Wurstwaren zu unterscheiden. Ein eindeutiger Nachweis war jedoch mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung auf die für Sojavollmehl und Sojakeimmasse typischen "Sanduhrförmigen Trägerzellen" zu führen, wie sie bei NIEMEYER (1942) und MIERMEISTER (1942) beschrieben worden ist. MIERMEISTER (1942) entwickelte ein anderes Nachweisverfahren, das eine annähernd mengenmäßige Erfassung des Sojakeimmassengehaltes ermöglichte. Es beruhte auf der Bestimmung des Rohfaseranteils, der durch die Keimmasse in das Wurstgut gelangt war. Mit Ausnahme von Leberwürsten, bei denen ein besonders starker Anteil an pflanzlicher Rohfaser durch die Gewürze zu verzeichnen war, konnte MIERMEISTER (1942) den Sojazusatz auf + 2 % genau bestimmen.

HENNEBERG (1942) beobachtete eine veränderte Färbung der Schnittfläche von Brühwürsten, die unter Verwendung von Sojamehl hergestellt worden waren. Ein 10 %iger Zusatz von Sojamehl war bereits bei einfacher Betrachtung von Wurstanschnitten im Tageslicht an einer fahlgelben Farbe zu erkennen. Geringere Zusätze von 3 - 5 %, die im Tageslicht nicht mehr erkannt wurden, konnten unter der UV-Lampe eindeutig an einer gelblichen Verfärbung der normalerweise

blauen bis blauvioletten Schnittfläche erkannt werden. Zusätze von 0 - 20 % konnten mit einer Genauigkeit von ± 2 % bestimmt werden.

Auf dem Gehalt der Sojabohne an nicht vergärbarem Zucker beruht eine von HENDREY (zitiert bei FLEISCHMANN (1966)) entwickelte Methode zur Erfassung von Sojazusätzen in Fleischwaren.

BAILEY sowie OSBORN u. CAMPELL (zitiert bei FLEISCHMANN (1966)) bestimmten mit einer Eiweißtrennungsmethode das für die Sojabohne typische Eiweiß Glycinin in den mit Sojamehl oder -keimmasse versetzten Würsten.

FREIMUTH u. KRAUSE (1969) berichteten kürzlich von einem Sojaproteinnachweis mittels der Elektrophorese in Polyacrylamidgel. Sojaproteinzusätze wurden dabei an zwei typischen Banden, von denen eine dem Glycinin zugeordnet werden konnte, von 0,5 % an erkannt. Durch densitometrische Auswertung der Elektropherogramme soll über eine Vergleichsuntersuchung von Proben mit bekanntem Gehalt eine semiquantitative Beurteilung der Zusatzmengen möglich sein.

III. Serologische Nachweismethoden

Die heute auf dem Markt befindlichen, isolierten Sojaproteine enthalten keine zelligen Bestandteile mehr; die in der Bohne ursprünglich enthaltenen, nicht vergärbaren Zucker sind während des Aufbereitungsprozesses eliminiert und das für die Sojabohne typische Eiweiß Glycinin ist durch die Einwirkung von Hitze, organischen Lösungsmitteln, Säuren und Laugen in seiner Tertiärstruktur weitgehend verändert worden. Die oben aufgeführten Verfahren zum Nachweis von Sojaprodukten in Fleischerzeugnissen sind deshalb zum Nachweis des isolierten Sojaproteins nicht mehr geeignet. Zwar gestatten, wie FREIMUTH u. KRAUSE (1969) sowie OLSMAN (1967) zeigen konnten, rein chemische Verfahren auch angesichts dieser veränderten Umstände noch

den Nachweis von Sojaprotein und aME in Fleischwaren, doch besitzen sie nicht die für die Lebensmittelüberwachung erforderliche Empfindlichkeit. OLSMAN (1967) konnte mittels der Harnstoff-Stärkegel-Elektrophorese Zusätze von aME oder Sojaprotein in Luncheonmeat erst ab 0,5 % bzw. 1 % nachweisen.

Zwar ist für ein "nicht zugelassenes" Fremdeiweiß ein qualitativer Nachweis für die lebensmittelrechtliche Beurteilung in der Regel ausreichend, doch muß auch ein qualitativer Nachweis geringere Mengen als die auf chemischem Wege erfaßbaren, feststellen können. Der für ein "zugelassenes" Fremdeiweiß darüber hinaus erforderliche exakte quantitative Nachweis kann umso weniger auf chemischem Wege erbracht werden. Diesen Anforderungen werden zur Zeit nur serologische Nachweisverfahren gerecht.
Die Mehrzahl dieser Verfahren ist bis jetzt jedoch auch nur für eine qualitative oder bestenfalls grob-quantitative Aussage geeignet, wie z.B. die "Agar-Gel-Diffusion", die "Röhrchenpräzipitation" und die "Immunfluoreszenz".

Dagegen erheben die folgenden drei Verfahren Anspruch auf eine quantitative Aussagekraft:

die Indirekte Hämagglutination in der Modifikation nach KOTTER u. HERRMANN (1963, 1965, 1965, 1968),

die Quantitative Präzipitatmessung nach DEGENKOLB u. HINGERLE (1967, 1969),

die Immunelektrophorese in der Modifikation nach SINELL u. KLUGE-Wilm (1967, 1968).

Diese drei Verfahren zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen sind bisher mehrfach und mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen überprüft und diskutiert worden (DEGENKOLB u. HINGERLE,(1967, 1969); ENOCH (1967); HERRMANN u. KOTTER (1968); KLUGE-WILM (1967); SINELL u. KLUGE-WILM (1968)).
Sie sind zum Teil auch bereits erfolgreich zum Nachweis von Sojaprotein benutzt worden (DEGENKOLB u. HINGERLE (1967, 1969); GÜNTHER (1969); HERRMANN u. KOTTER (1968)).

Es ist die Aufgabe dieser Arbeit, die praktische Eignung dieser drei Nachweisverfahren für Sojaprotein zu prüfen und zu vergleichen.
Im folgenden soll daher ein kurzer Abriß ihrer Entwicklung gegeben werden.

1. Präzipitation

Die serologischen Verfahren, die im Gegensatz zur chemischen Eiweißdifferenzierung unter den Begriff der "biologischen Eiweidifferenzierung" zusammengefaßt wurden, führte PAUL UHLENHUTH zu Anfang dieses Jahrhunderts in die Fleisch- und Lebensmittelhygiene ein. Seine grundlegenden und umfangreichen Untersuchungen basieren auf der Präzipitation, die den für die Belange der biologischen Eiweißdifferenzierung beherrschenden Reaktionstyp zwischen Antigen und homologem Antikörper darstellt (UHLENHUTH (1901, 1930)).
Auch SCHMIDT (1955) unterstreicht die besondere Bedeutung der Präzipitation in der Serologie, indem er sie als die "einfachste in vitro vor sich gehende Reaktion zwischen Antigen und Antikörper" bezeichnet.

Die Röhrchenpräzipitation nach UHLENHUTH (1930) wurde ursprünglich als Mischung von klaren Antigen- und Antiserumverdünnungen im Reagenzglas vorgenommen und die Reaktions-Geschwindigkeit und -Intensität an der auftretenden Trübung und Ausflockung des Gemisches abgelesen.
Eine Steigerung der Empfindlichkeit dieser Reaktion konnte UHLENHUTH (1901, 1930) durch die Einführung der "Ringpräzipitation" erreichen, bei der im Gegensatz zu der Durchmischung der Antigen- und Antikörperlösungen eine Über- oder Unterschichtung der beiden Komponenten im Reagenzglas vorgenommen wurde; an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeiten bildete sich eine ringförmige Trübungsfläche aus.

UHLENHUTH (1901, 1930) führte sein Verfahren der Eiweißdifferenzierung als Standarduntersuchungsmethode für importiertes Fleisch an Grenzschlachthöfen ein.

Hatte UHLENHUTH die Präzipitation im wesentlichen für die Differenzierung nativer Proteine benutzt, so konnte in neuerer Zeit SINELL (1960, 1961, 1962, 1968) in Anknüpfung an die Untersuchungen von UHLENHUTH mit Hilfe der Ringpräzipitation gekochte und hocherhitzte Muskelproteine differenzieren.

HELLMANN (1968) konnte mit der Ringpräzipitation eine quantitative Abstufung von Eiklarzusätzen in Brühwürsten durchführen.

Eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit und eine Vermehrung der Anwendungsmöglichkeiten erreichte OUCHTERLONY (1958, 1962) durch die Verlegung der Präzipitation in ein halbfestes Medium, die sogenannte Agar-Gel-Diffusion. Im Fall einer positiven Reaktion wird der klare Agar durch scharf konturierte Präzipitatbanden getrübt, die sich durch nachträgliche Anfärbung noch zusätzlich hervorheben lassen.
Diese Methode erfuhr zahlreiche Abwandlungen. Ein Objektträgerverfahren gestattet die Ausführung der Reaktion mit kleinsten Mengen von Antigen- und Antikörpern.
In der Fremdeiweißserologie fand die Agar-GelDiffusion als qualitatives oder grob-quantitatives Verfahren vielfache Anwendung.
ENOCH (13) benutzte die Methode zum Nachweis von Trockenblutplasma in Rindsbrät.
WYLER und SIEGRIST (1965) wiesen auf diesem Wege aME in Fleischkonserven nach.
GÜNTHER (1969) führte den Nachweis von aME, Sojaprotein und HE mit der Objektträgerdiffusion nach SCHEIDEGGER und der quantitativen Auswertung nach DARCY.

DEGENKOLB (1965) arbeitete am Nachweis von aME ebenfalls mit der Agar-Gel-Diffusion, zeigte sich jedoch nicht befriedigt von den Ergebnissen.
DEGENKOLB u. HINGERLE (1967, 1969) entwickelten einen zeit- und materialsparenden, quantitativen Fremdeiweißnachweis auf der Basis der Präzipitation, den sie als "abgestuften Serotest" bezeichneten. Bei der Durchführung der Indirekten Hämagglutinationshemmungsreaktion nach KOTTER u. HERRMANN (1968) beobachteten die Autoren bei der Inkubierung der Untersuchungsextrakte mit dem homologen Antiserum ein regelmäßiges und konzentrationsabhängiges Auftreten von Präzipitatmengen. Sie erkannten, daß diese Präzipitation der Ausdruck der erfolgten Abschwächung des Serumantikörpertiters sein mußte, die in der darauf folgenden, aufwendigen Hämagglutinationsreaktion abgelesen und quantitativ ausgewertet wurde. Angesichts ihres großen Probeneinganges entschlossen sie sich zu einer direkten Auswertung dieser Präzipitatmengen, ohne erst den Umweg über die arbeitsintensive und mit zusätzlichen Fehlerquellen behaftete Indikatorreaktion der Erythrozytenagglutination zu beschreiten. Auf diese Weise waren DEGENKOLB u. HINGERLE (1969) in der Lage, aME und Sojaprotein in bis auf 115°C erhitzten Fleischwarenkonserven und TBP in Roh- und Brühwürsten quantitativ nachzuweisen, wobei die Genauigkeit der quantitativen Abstufung mit der der indirekten Hämagglutination gleichzusetzen ist.

Von besonderer Bedeutung für die wirtschaftliche Durchführung des "abgestuften Serotest" zur Fremdeiweißuntersuchung sind die qualitativen "Auswahluntersuchungen" nach dem Vorbild der Röhrchenpräzipitation nach UHLENHUTH, die nach 30 Minuten eine Aussage über die zugesetzte Fremdeiweißart zulassen; bei negativem Ausfall dieser Reaktion wird auf eine weitere Untersuchung verzichtet. Bei positivem Ausfall auf ein- oder mehrere Fremdeiweiße werden in einer daran anschließenden "Voruntersuchung" die verdächtigen Extrakte mit einer

festgesetzten Menge Antiserum inkubiert, die gebildeten Präzipitate in eine Kapillare gesaugt und darin zentrifugiert. Über einen Vergleich mit bekannten Ergebnissen oder über eine Eichkurve ist dergestalt nach weiteren 30 Min. eine grob-quantitative Aussage möglich. Erst wenn sich in dieser "Voruntersuchung" eine deutliche Überschreitung der deklarierten oder zulässigen Zusatzmenge herausstellt, führen die Autoren die genaue "Quantitative Untersuchung" durch, die einen ähnlich hohen Aufwand an Antiserum erfordert wie die indirekte Hämagglutination nach KOTTER u. HERRMANN (1968). Dieser Aufwand kann jedoch durch die vorangegangenen qualitativen und grob-quantitativen Untersuchungen auf wenige Proben beschränkt werden.

Die Immunelektrophorese nach GRABAR u. WILLIAMS (1953) stellt durch die Kombination von physikalisch-chemischen Vorgängen mit einer serologischen Reaktion einen Sonderfall der Präzipitationsreaktion dar.
Sie besitzt eine besondere Bedeutung und hat sich bereits mit Erfolg auch in die Fremdeiweißserologie eingeführt. Ihre Entwicklung wird daher gesondert besprochen.

2. Indirekte Hämagglutination

Die indirekte Hämagglutination, heute eine der empfindlichsten serologischen Arbeitsmethoden, verdankt ihre Einführung in die Laboratoriumsdiagnostik einer Beobachtung von KRAUS u. LUDWIG (1902). Sie entdeckten und beschrieben als erste 1902 die Verklumpung von roten Blutkörperchen in Gegenwart von Staphylokokken und Vibrionen.

Ähnliche Beobachtungen wurden in der Folgezeit mit anderen Bakterien und vor allem mit Viren gemacht.

Dieses als "Direkte Hämagglutination"bezeichnete Phänomen war noch nicht im eigentlichen Sinne eine serologische Reaktion in Form einer Interaktion von Antigen und homologem Antikörper.

Erst 1947 beobachteten KEOGH, NORTH und WARBURTON, daß Antigene von Haemophilus influencae an rote Blutkörperchen adsorbiert werden konnten, ohne sie "direkt" zu agglutinieren, und erst die Zugabe von spezifischem Antiserum zu ihrer Verklumpung führte.
Für eine derartige Reaktion von "modifizierten Erythrozyten" (NETER (1956)) mit homologem Antiserum setzte sich im deutschen und angelsächsischen Schrifttum die Bezeichnung "Indirekte Hämagglutination" durch.

Dank ihrer Eigenschaft, auch normalerweise unsichtbare Antigen-Antikörper-Reaktionen über die Agglutination der Erythrozyten sichtbar zu machen, wurde die indirekte Hämagglutination (i.H.) in der Mikrobiologie und der Klinischen Human- und Veterinärmedizin bald unentbehrlich.

MIDDLEBROOK u. DUBOS (1948) führten 1948 die i.H. in die Tuberkulosediagnostik beim Mensch und Tier ein. Sie entwickelten darüber hinaus einen i.H.-Hemmungstest, der es ihnen gestattete, geringe Mengen tuberkulösen Antigens quantitativ zu bestimmen.

BRODHAGE u. BOURGEOIS (1954) erhielten bei der Untersuchung von 200 Tuberkulose-Reagenten mittels der i.H. nach MIDDLEBROOK u. DUBOS einen positiven Ausfall der Reaktion bei 51 % der untersuchten Seren.

BRODHAGE u. FEY (1955) führten Hämagglutinationsreaktionen auf Brucellose und Tuberkulose mit Menschen-, Rinder- und Kaninchensera durch.

BECHT (1958) modifizierte Erythrozyten mit einem Essigsäureextrakt von Brucella abortus und agglutinierte sie mit Seren von brucellosekranken Rindern. Um unspezifische Agglutinationen durch die Rinderseren auszuschalten, benutzte er Rindererythrozyten.

NETER, WESTPHAL, LÜDERITZ u. GORZYNSKI (1956) adsorbierten verschiedene Enterobakterien-Antigene in ungereinigter und gereinigter Form an Erythrozyten von Mensch und Schaf. Mit derart modifizierten roten Blutkörperchen konnten sie in der i.H. sowohl die Keimart als auch die Höhe des homologen Titers in menschlichen Seren bestimmen. Sie stellten fest, daß gereinigte Antigene mit Lipopolysaccharidnatur sich in Gegenwart von 5 % Glukose oder Saccharose nicht,in isotonischen Lösungen von Elektrolyten wie NaCl, KCl oder Na-Citrat dagegen ohne Schwierigkeit an Erythrozyten adsorbieren lassen. Es gelang ihnen, mehrere Enterobakterien-Antigene simultan an Erythrozyten zu adsorbieren und damit die Möglichkeit zu einer polyvalenten i.H. zum Nachweis von Enterobacteriaceen zu eröffnen.

In Erkennung der Tatsache, daß sich Antigene mit Polysaccharidnatur ohne weiteres an die Oberfläche von Erythrozyten anheften lassen, Antigene mit Proteinnatur sich jedoch zum "Sensibilisieren" von Erythrozyten nicht eignen, empfahl BOYDEN (1951) eine Behandlung der roten Blutkörperchen mit Gerbsäure vor dem Aufbringen des Proteinantigens. Er begründete diese Maßnahme mit der Lipoidstruktur der Erythrozytenmembran (BOYDEN u. GRABAR (1954)).

HELLER, JACOBSON, KOLODNY u. KAEMMERER (1954) gelang es, derart mit Gerbsäure vorbehandelte Erythrozyten mit Gammaglobulinen zu beladen und mit Seren von Patienten zu agglutinieren, die an akuter rheumatischer Arthritis litten.

STAVITSKY (1954) konnte mit Hilfe der Gerbsäurebehandlung nach BOYDEN Rinder-Gammaglobulin, Rinder-Serumalbumin, Eialbumin, Konalbumin, Ovomukoid, Eiklar, die Lecithinase des Alpha-Toxins von Cl.welchii (P IV), Diphterietoxoid und Tetanustoxoid an die Erythrozytenoberfläche zum Teil simultan anheften. Darüber hinaus gelang ihm die quantitative Bestimmung eines Proteins

in einem Proteingemisch mit der i.H.: Er bestimmte den Anteil von Eialbumin im Eiklar mit Hilfe eines über das Kaninchen gewonnenen Anti-Eialbumin-Serums, das er mit Konalbumin absättigte, um Kreuzreaktionen auszuschalten. Seine so erhaltenen Werte befinden sich in Übereinstimmung mit denen chemischer Analysen.

STAVITSKY u. ARQUILLA (1955) verglichen tanninisierte und mit Bis-Diazo-Benzidin vorbereitete Erythrozyten. Den mit Tannin vorbereiteten Zellen kommt danach die höhere Empfindlichkeit zu.

SINELL (1960, 1961) überprüfte die Eignung der i.H. für den Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine. Ihm gelang die Differenzierung von Extrakten aus Rind und Walfleisch, die auf 70°C erhitzt worden waren, in Verdünnungen bis 1 : 64.000.

HERRMANN (1963) konnte in Anlehnung an die Untersuchungen von BOYDEN mit einer modifizierten i.H. hitzedenaturiertes Hühnereiklar in Fleischwaren nachweisen. In weiteren Untersuchungen gelang HERRMANN (1965) die quantitative Erfassung des Zusatzes von HE und aME in bis auf 115°C hocherhitzten Fleischwaren in Konzentrationen ab 1 % bzw. 0,1 %.

HERRMANN, HOLPERT u. PFEIFFER (1968) konnten aME in bei 120°C autoklavierten Wurstkonserven nachweisen. Selbst nach dieser hohen Erhitzung war eine quantitative Bestimmung von aME mit Hilfe der i.H. möglich.

Nach KOTTER, HERRMANN u. CORSICO (1966) gestattet die i.H. den quantitativen Nachweis von aME in auf 115°C hocherhitzten Fleischerzeugnissen in Konzentrationen ab 0,1 %.

KLUGE-WILM (1967) führte vergleichende Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von aME in hocherhitzten Fleischwaren mittels der i.H. und der Immunelektrophorese

durch. Sie konnte die Ergebnisse von HERRMANN (1965), HERRMANN, HOLPERT u. PFEIFFER (1968) und KOTTER, HERRMANN u. CORSICO (1966) nicht bestätigen. Sie berichtete dagegen von guten Ergebnissen mit der Immunelektrophorese.

ENOCH (1967) verglich die Agar-Gel-Diffusion, Immunelektrophorese und i.H. bezüglich ihrer Eignung zur serologischen Differenzierung von TBP in hocherhitzten Fleischwaren. Ihrer Meinung zufolge muß der i.H. in diesem Zusammenhang eindeutig der Vorzug gegenüber anderen serologischen Methoden gegeben werden.

KOTTER u. HERRMANN (1968) empfehlen die i.H. als quantitative Nachweismethode für aME, TBP, Sojaprotein, Molkenprotein, Ovalbumin und HE in Fleischerzeugnissen.

DEGENKOLB u. HINGERLE (1967, 1969) führten praxisbezogene Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen, darunter auch des Sojaproteins, in hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen durch. Sie halten den Aufwand der i.H. in der Lebensmitteluntersuchung auf breiter Ebene für nicht gerechtfertigt; stattdessen führen sie die i.H. nur in strittigen Einzelfällen zur Ergänzung ihres auf der Präzipitation basierenden "abgestuften Serotests" aus.

3. Immunelektrophorese

GRABAR u. WILLIAMS (1953) wandten mit der Synthese von Antigen-Antikörper-Reaktionen im Agar-Gel nach OUCHTERLONY (1958, 1962) und der Auftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld nach TISELIUS (1937, 1938) erstmals das Prinzip der Immunelektrophorese (IE) an. Mittels dieser Technik waren WILLIAMS u. GRABAR (1955) in der Lage, wenigstens 16 deutlich voneinander unterschiedene Komponenten des menschlichen Serums festzustellen. Die Alpha-1-Globuline konnten von ihnen in 2, die Alpha-2-Globuline in 5 und Beta-1-Globuline in 4 Komponenten zerlegt werden.

In anschließenden Untersuchungen trennten sie Immunseren von Pferd, Esel und Kaninchen auf und präzipitierten sie mit den entsprechenden homologen Antigenen (WILLIAMS u. GRABAR (1955)).
Die hohe Leistungsfähigkeit dieser kombinierten Reaktion und ihre vielseitige Verwendbarkeit führten in der Folgezeit zu einer raschen Weiterentwicklung und zu zahlreichen Modifikationen.
Über weitere Möglichkeiten der IE nach GRABAR berichten SCHEIFFARTH u. Mitarb. (1956).

Die für die breite Anwendbarkeit bedeutsamste Modifikation der IE war die Einführung einer Mikromethode durch SCHEIDEGGER (1955). Gegenüber der Originalmethode von GRABAR u. WILLIAMS erforderte sie nur einen Bruchteil des Aufwandes an Material und Zeit. Zu einer Untersuchung sollen nach SCHEIDEGGER schon 0,005 ml Serum ausreichend sein.

Eine ähnliche sparsame Abänderung der Originalmethode entwickelten WADSWORTH u. HANSON (1960). Sie erweiterten ihre Technik noch durch die Einbeziehung einer dritten Reaktionskomponente nach dem Vorbild der Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (1962) zur sogenannten "komparativen IE". Dieses Vorgehen gestattete ihnen den Nachweis von Antigenen oder Antikörpern in niedrigeren Konzentrationen als mit Hilfe der Originalmethode.

HANSON (1964) benutzte die komparative IE zum qualitativen Nachweis von Kasein in Fleischwaren. Er konnte so noch einen Trockenmilchzusatz von 0,1 % im Untersuchungsmaterial nachweisen.

KLUGE-WILM (1967) prüfte die IE in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER auf ihre Eignung zum Nachweis von aME in reinen Lösungen, sowie als Zusatz zu Fleischwaren, die verschieden hoch erhitzt worden waren. Sie erreichte nicht nur eine sichere qualitative Erkennung des Fremdeiweißes in allen untersuchten Lösungen und Fleischwaren

vom rohen bis zum autoklavierten Zustand, sondern konnte auch die Fähigkeit der IE zu konzentrationsabhängiger Abstufung und quantitativer Ermittlung des Fremdeiweißzusatzes in Brühwürsten nachweisen.

ENOCH (1967) untersuchte Würste mit Zusätzen von TBP u.a. auch mit Hilfe der IE. Sie spricht auf Grund ihrer Ergebnisse der IE die Tauglichkeit als quantitative Nachweismethode ab. Selbst ein qualitativer Nachweis von TBP mittels der IE sei nur in bis auf 80°C erhitztem Material möglich.

SINELL (1968), SINELL u. KLUGE-WILM (1968) und SINELL u. MENTZ (1969) benutzten die IE zur Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln. Die Bestimmung artspezifischer Sarkoplasmaproteine gelang ihnen selbst in Fleischkonserven, die bei 120°C autoklaviert worden waren.

Zusätze von aME zu Fleischerzeugnissen konnten in allen üblichen Erhitzungsstufen an Hand der gebildeten Präzipitate quantitativ ausgewertet werden.
Der qualitative Nachweis von aME-Zusätzen war auch nach der Einwirkung von 125°C noch sicher zu erbringen; die nachlassende Konzentrationsabhängigkeit der gebildeten Präzipitate ließ allerdings bei dieser unüblichen, ultrahohen Erhitzung eine quantitative Aussage nicht mehr zu.

HERRMANN u. KOTTER (1968) halten in diesem Zusammenhang bestenfalls eine "semiquantitative" Aussage der IE für möglich.

Die Empfindlichkeit der IE stellte zuletzt GÜNTHER (1969) bei der Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren unter Beweis; ihm gelang der Nachweis von Sojaprotein noch in einer Konzentration von 0,05 %.

IV. Verfahren zur Antiserumherstellung

Die Antiserumgewinnung ist als elementare Voraussetzung allen serologischen Arbeitsmethoden gemein. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Herstellung hochwertiger Antiseren zur Eiweißdifferenzierung. Die größten Erfahrungen liegen auf dem Gebiet der Serum- und Muskelproteine vor, während die sog. Fremdeiweiße erst durch ihre lebensmittelrechtliche Bedeutung in den letzten Jahren zum Objekt immunologischer Forschungstätigkeit geworden sind. Auf diesem Grund wird bei der Herstellung von Antiserum gegen Fremdeiweiße immer wieder auf Arbeitsmethoden zurückgegriffen, die sich bereits bei anderen Fragestellungen bewährt haben.

Die Mehrzahl der Autoren benutzt als Serumspender Bastarde des Stallkaninchens; DEGENKOLB (1965) und CATSIMPOOLAS u. MEYER (1968) verwenden rassereine Tiere und zwar "weiße Neuseeländer" bzw. "Deutsche Riesen".
Übereinstimmend wird als günstigstes Körpergewicht der Tiere 3 bis 3,5 kg und ein Alter von ca. 6 Monaten angegeben. Lediglich bei SINELL u. MENTZ (1969) ist eine größere Toleranz mit 3,3 bis 5,8 kg angegeben.

Das Geschlecht der Versuchstiere wird von allen Autoren zwar nicht als ausschlaggebend angesehen, doch wird "im allgemeinen den männlichen Tieren der Vorzug gegeben" (HERRMANN (1968)).

Die Immunisierungsmethoden unterscheiden sich voneinander in sehr vielen Details. Selbst allgemein bekannte Methoden sind von nahezu jedem Autor in irgendeiner Form variiert worden. Neben der Höhe der verabreichten Dosis, die bei den einzelnen Antigenen unterschiedlich und nicht vergleichbar ist, soll noch auf folgende wesentliche Unterschiede hingewiesen werden:

1. die Art der Verabreichung und
2. die Hilfsstoffe.

Zu 1:

Die Verabreichung kann auf intrakutanem, subkutanem, intramuskulärem, intravenösem oder intraperitonealem Wege erfolgen. Welche Injektionstechnik im Einzelfall gewählt wird, hängt von Menge und Eigenschaften des zu verabreichenden Antigens, dem gewünschten Erfolg der Immunisierung und schließlich auch von den Möglichkeiten ab, die das Versuchstier selbst bietet.

Ein direkter Zusammenhang besteht zwischen der Verabreichungsart und der Resorptionsgeschwindigkeit; während die intrakutane, die subkutane, die intramuskuläre und die intraperitoneale Technik das Antigen mehr oder weniger dauerhaft "deponiert", wird es bei intravenöser Gabe direkt an das flüssige Vehikel Blut abgegeben, d.h. "infundiert". Dadurch wird das gesamte RHS und die ihm zugehörigen Organe nahezu gleichzeitig mit der gesamten Menge des Antigens in Berührung gebracht, während die Technik des Deponierens in erster Linie eine lokale Wirkung auf Teile des RHS ausübt.

Während KOTTER u. Mitarbeiter (1966), HERRMANN (1968) und DEGENKOLB u. HINGERLE (1967) große Mengen Antigen an verschiedenen Stellen des Körpers subkutan deponieren, halten WARNECKE u. SAFFLE (1968) das intramuskuläre Depot mit kleinen Antigenmengen für am besten geeignet.

FROMM (1964) zieht die bisher "übliche i.v.-Immunisation" dem subkutanen Depot vor.

SINELL (1968), SINELL u. KLUGE-WILM (1968) sowie SINELL u. MENTZ (1969) verwenden mit gutem Erfolg eine Kombination von intrakutanem Depot und intravenöser Infusion bei stets kleinen Antigenmengen.

Neben der Applikationsform ist die Aufteilung der Gesamtdosis in eine unterschiedliche Anzahl von Einzelgaben und deren zeitliche Aufeinanderfolge von entscheidender Bedeutung.
KOTTER, HERRMANN, RING u. CORSICO (1966) sowie FINGER (1964) berichten von einschlägigen Versuchen. FINGER (1964) hebt

anhand mehrerer Quellen hervor, daß die Aufteilung einer Antigendosis in kleinere Einzeldosen und deren schnelle Verabreichung hintereinander, teilweise nur mit Stundenabstand, grundsätzlich immer bessere Ergebnisse gibt, als die geschlossene Verabreichung der Gesamtdosis.

KOTTER u. Mitarb. (1966) stellten fest, daß für die von ihnen empfohlene subkutane Verabreichung von großen Antigenmengen, nämlich 15 g pro Versuchstier, bei einer Aufteilung in 15 gleich große Einzeldosen bei 2-tägiger Aufeinanderfolge der Injektionen die besten Ergebnisse erzielt wurden. Eine Vergrößerung des Injektionsintervalls auf 5 Tage hatte schlechtere Ergebnisse zur Folge. DEGENKOLB u. HINGERLE (1967) erzielten mit der gleichen Anordnung von 15 Einzeldosen bei 2-tägigem Injektionintervall ebenfalls gute Ergebnisse.

SINELL u. KLUGE-WILM (1968) teilten die Gesamtmenge in 4 Einzeldosen auf, wovon die kleinste zu Beginn der Immunisierung in Freundschem Adjuvans emulgiert verabreicht wurde. Die Hauptmasse des Antigens verteilte sich jedoch auf 3 Injektionen, die an 3 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben wurden.

CATSIMPOOLAS u. MEYER (1968) immunisierten Kaninchen mit Sojaprotein, indem sie die Antigenmenge auf 3 Injektionen mit 7-tägigem Abstand verteilten.

WARNECKE u. SAFFLE (1968) berichten von einer Verteilung der Gesamtdosis auf 6 Einzeldosen, wobei 4 Injektionen mit 2-tägigem Abstand nach einem 10-tägigen Intervall von 2 weiteren Injektionen mit 2-tägigem Abstand gefolgt wurden. Ähnlich gute Resultate erreichten dieselben Autoren jedoch auch mit der folgenden Anordnung: 2 Injektionen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen, gefolgt von 22 Tagen Ruhe und weiteren 2 Injektionen mit anschließenden weiteren 21 Ruhetagen bis zur Blutentnahme.

Zu 2:

Die Wahl der zur Immunisierung eingesetzten Hilfsstoffe steht wiederum in engem Zusammenhang mit der Applikationsart. Es sind im wesentlichen 2 Gruppen von Hilfsstoffen, die hier berücksichtigt werden müssen:
Die Metallsalze, von denen besonders Mg-, Ca-, Al- und Fe-Salze Bedeutung besitzen (FINGER (1964); KOTTER u. Mitarbeiter (1966); RING (1964)) und die organischen Substanzen wie Polysaccharide sowie natürliche und synthetische Fette und Öle (FINGER (1964)).

In neueren Arbeiten ist besonders Aluminiumhydroxyd und Eisen-III-Chlorid sowie von den organischen Substanzen das Freundsche Adjuvans in kompletter und inkompletter Form benutzt worden.

Die intravenöse Applikation von Freundschem Adjuvans wurde bisher nicht beschrieben. Dagegen ist die Verwendung von Eisen-III-Chlorid auf intravenösem Wege am verträglichsten, wie KOTTER u. Mitarb. (1966) berichten.

HERRMANN (1968) und DEGENKOLB u. HINGERLE (1967), die Antigenmengen von 15 bzw. 7,5 g für eine Immunisierung benutzen, arbeiteten mit dem subkutan am besten anwendbaren Aluminiumhydroxydgel in 1,5%iger (HERRMANN (1968) bzw. 0,75%iger Konzentration (DEGENKOLB u. HINGERLE (1967)).

CATSIMPOOLAS u. MEYER (1968), SINELL u. Mitarb. (1968, 1969) und WARNECKE u. SAFFLE (1968), die mit geringen Antigenmengen immunisierten, unterstützten die Antikörperbildung durch den Einsatz von Freundschem Adjuvans.

Neben den bisher berücksichtigten Fragen der Antigendosis, des Injektionsmodus und der Hilfsstoffe ist die Antigenaufbereitung entscheidend für die Titerhöhe und die Spezifität des hergestellten Antiserums.
In der Lebensmittelüberwachung werden vorwiegend Antiseren zum Nachweis von erhitztem bzw. autoklaviertem Eiweiß benötigt. Der Nachweis von unerhitztem Material nimmt dagegen nur einen kleinen Raum ein.

Zur Herstellung derartiger Antiseren sind bekanntlich nur hitzemodifizierte Antigene in der Lage. Es ist jedoch nicht einheitlich festgelegt, wieweit diese Hitzeveränderung durchgeführt werden soll.

HERRMANN (1968) empfiehlt die Behandlung des nativen Antigens mittels der "Hitze-Akali-Präzipitation nach W.H. SCHMIDT". Diese Methode sieht eine Erhitzung auf 70°C über 30 Min. vor; anschließend wird das Antigen mit 1 n NaOH versetzt, nochmals 15 Min. auf 70°C erhitzt, und anschließend mit 1 n HCl neutralisiert.

DEGENKOLB u. HINGERLE (1967) halten eine Erhitzung auf 75°C über 30 Min. in physiologischer Kochsalzlösung für erforderlich. Bei Pflanzeneiweiß ist nach ihren Angaben jedoch ein anderes Vorgehen notwendig: Um die Wirksamkeit des Serums auch gegen bis auf 117°C hocherhitztes Material sicherzustellen, muß eine Erhitzung des Antigens auf 110°C über 30 Min. erfolgt sein. Für den Nachweis des Sojaproteins ist also nach Meinung von DEGENKOLB u. HINGERLE (1967) die Herstellung zweier Antiseren nötig: a) gegen bis auf 80°C erhitztes Material, b) gegen höher als 80°C erhitztes Material.

SINELL u. KLUGE-WILM (1968) vertreten die Ansicht, daß z.B. für den Nachweis von aME in Fleischwaren ein Antiserum nötig sei, das mit einem bis auf 100°C erhitztem Antigen hergestellt worden ist. Diese Erhitzung inaktiviert einerseits die im aME vorhandenen Reste von Serumalbumin und schaltet dadurch Kreuzreaktionen aus, beeinträchtigt aber andererseits noch nicht die antigene Wirksamkeit der milchspezifischen Proteine.

Um wirksame Antiseren gegen Sojaprotein zu bekommen, immunisierte HERRMANN (1968) mit einem Extrakt aus Sojabohenmehl, während DEGENKOLB u. HINGERLE (1967) isoliertes Sojaprotein benutzten. Die Immunisierung mit Sojabohnenmehl soll nach HERRMANN (1968)* den Vorteil haben, gleichzeitig Antikörper

* persönliche Mitteilung

gegen verschiedene im Handel befindliche Sojaproteine zu bilden, während die Reaktionsbreite eines Serums gegen ein bestimmtes Sojaprotein einem anderen Präparat gegenüber deutlich geringer sein soll.

V. Verfahren zur Extraktion des Untersuchungsgutes

Eine weitere Vorbedingung für die Durchführung der serologischen Lebensmitteluntersuchung ist die ausreichende Extraktion des gesuchten Proteins oder Proteingemisches aus dem Untersuchungsgut.
Lediglich der Nachweis des Antigens mittels fluoreszeinmarkierter Antikörper nach der Methode von COONS u. KAPLAN kann auf die Extraktion des Antigens verzichten.

Die grundlegende Bedeutung der Extraktion des Antigens, die ebenso wie die Qualität des verwendeten Antiserums über Erfolg oder Mißerfolg der serologischen Untersuchung entscheidet, wird schon von W.A. SCHMIDT (1908) hervorgehoben. Er schreibt die begrenzte serologische Aktivität von erhitztem Eiweiß nicht in erster Linie der Hitzemodifikation zu, denn ihm gelang die Herkunftsbestimmung von Eiweiß, das er im Laboratorium eine Stunde auf 100°C erhitzt hatte. "In der Praxis gestalten sich die Verhältnisse leider weit schwieriger", meint der Autor, "nämlich in den Fällen, wo das Eiweiß infolge des Erhitzens völlig unlöslich geworden ist. Hierdurch wird der Anwendung der Präcipitinmethode in der Praxis leider allzuoft eine Grenze gesetzt".

ROSENBERG (1926) betont, daß der Einsatz von Thermoantiseren allein nicht die Probleme der Differenzierung erhitzten Eiweißes lösen kann: "Ausschlaggebend für die praktische Verwertung dieses Vorteils ist die Möglichkeit der Herstellung eines für die Reaktion brauchbaren Auszuges aus solchem erhitztem Untersuchungsmaterial".

Auch UHLENHUTH (1930) meinte, daß nicht nur die - seinerzeit noch ungelöste - Herstellung hitzespezifischer Antiseren der serologischen Differenzierung gekochten Fleisches im

Wege stünde, "auch die Schwierigkeit, aus gekochtem Fleisch gut reagierbare Extrakte zu gewinnen, wird nicht leicht zu überwinden sein".

Die Extraktion des Untersuchungsgutes wird auch heute noch als Problem angesehen und bestimmt weiterhin neben anderen Faktoren die Grenzen der Leistungsfähigkeit unserer serologischen Nachweismethoden (SINELL (1968); SINELL u. KLUGE-WILM (1968); SINELL u. MENTZ (1969); HERRMANN u. KOTTER (1968); KOTTER u. HERRMANN (1968); KOTTER, HERRMANN, CORSICO (1966); DEGENKOLB u. HINGERLE (1967, 1969); GÜNTHER (1969)).

Im Zusammenhang mit der Erkennung und quantitativen Bestimmung von Fremdeiweißzusätzen in Fleischerzeugnissen wird von verschiedenen Extraktionsverfahren berichtet, die sich nicht nur in bezug auf das verwendete Extraktionsmittel unterscheiden, sondern auch bezüglich Extraktionsdauer, Extraktionstemperatur, Angebot des Lösungsmittels, pH-Wert des Lösungsmittels und Zerkleinerungsgrad sowie sonstige Vorbehandlung des Untersuchungsgutes, wie Dialyse und Lyophilisation voneinander abweichen.

DEGENKOLB u. HINGERLE (1967, 1969) untersuchten Brüh-, Roh- und Dosenwürste auf TBP, aME und Sojaprotein. Sie bestimmten zuerst den Wassergehalt des Untersuchungsgutes. Zu 15 g gewolften Materials gaben sie je nach Wassergehalt 20 - 40 ml physiol. NaCl. Sie homogenisierten das Gemisch dann mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Gerätes für 30 sek. bei 24.000 u/Min. Das Homogenisat stellten sie durch Zugabe einiger Tropfen NaOH auf pH 7,5 - 8,0 ein. Der wäßrige Extrakt wird durch scharfes Zentrifugieren von fettigen und festen Bestandteilen befreit. Die Autoren benötigten weniger als 15 Min. zur Herstellung dieses Extraktes, den sie anschließend noch dialysierten und lyophilisierten.

FROMM (1964) untersuchte Fleischkonserven auf den Zusatz von aME mit Hilfe der Latex-Partikel-Methode. Er extrahierte einen Gewichtsteil homogenisierten Doseninhaltes

unter sterilen Kautelen mit 5 Gewichtsteilen physiol. NaCl für eine Woche bei +2 bis +6°C. Eine Extraktion bei 40°C im Wasserbad über 90 Min. hatte etwas schlechtere Ergebnisse.

KOTTER u. HERRMANN (1966) geben für die Extraktherstellung folgendes Vorgehen an: Vom Untersuchungsmaterial, das nicht, bzw. nicht höher als 75 bis 80°C erhitzt worden ist, werden 100 Gramm fein zerkleinert und mit physiol. NaCl im Verhältnis 1 : 2 für 48 Stunden zur Extraktion im Kühlschrank bei 0 bis 4°C angesetzt. Anschließend wird zentrifugiert und der opalisierende Überstand als Antigen im Test verwendet. Wurde das zu untersuchende Material höher als 75 bis 80°C erhitzt, so wird die Probe fein zerkleinert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird anschließend ebenfalls im Verhältnis zum Frischgewicht 1 : 2 mit physiol. NaCl versetzt und 48 Stunden extrahiert. Die gleiche Methode benutzte ENOCH (1967) beim Nachweis von TBP in Würsten aus Rindfleisch.

KLUGE-WILM (1967) prüfte Brühwürste und Brühwurstkonserven auf aME mittels der IE. Sie übergoß 5 g der fein zerkleinerten Proben im Reagenzglas mit 5 ml kochender NaCl, schüttelte die Mischung kräftig und extrahierte anschließend 24 Stunden bei Zimmertemperatur.
Dieses Verfahren bewährte sich auch bei der quantitativen Bestimmung von aME in Fleischwaren mit Hilfe der IE (SINELL u. KLUGE-WILM (1968)).

OLSMAN (1967), der allerdings nicht serologisch, sondern mit Hilfe der Elektrophorese am quantitativen Fremdeiweißnachweis in Konserven arbeitete, benutzte 8m-Harnstofflösung als Extraktionsmittel. Er schwemmte 10 g Untersuchungsmaterial mit 100 ml 0,1 m Acetatpuffer bei pH 4,2 auf und ließ die Aufschwemmung unter gelegentlichem Umrühren eine Stunde stehen. Nach Abgießen der Fettschicht wurde die Aufschwemmung zentrifugiert und der Bodensatz gewaschen und getrocknet.

1 g dieses Trockengutes wurde mit 9 ml 8m-Harnstofflösung, 1 ml 0,76 m Tris-Citrat-Puffer und 5 Tropfen Mercaptoathanol 30 Sekunden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Nach 2-stündiger Extraktion bei 10°C war der Extrakt gebrauchsfertig.

Für die Anwendung der Harnstoffextraktion in der serologischen Lebensmitteluntersuchung sind jedoch zusätzliche Maßnahmen erforderlich, wie SINELL (1968) und SINELL u. MENTZ (1969) berichten.

GÜNTHER (1969) extrahierte Fremdeiweiß aus Fleischwaren für den Nachweis mittels Immunodiffusion und IE, indem er 10 g Fleischware und 20 ml Barbituratpuffer mit Seesand zermörserte und für 2 Std. bei 40°C im Brutschrank stehen ließ. Anschließend zentrifugierte er bei 2.000 g 10 Min. lang und benutzte den Überstand für die Reaktion. Für eine Wiederholung der Reaktion bewahrte er den Extrakt in tiefgekühltem Zustand bei -20°C auf. Ein mehrmaliges Auftauen soll vermieden werden. GÜNTHER hält ebenso wie FROMM (1964) ein Vorgehen unter sterilen Kautelen für angebracht.

C. Eigene Versuche

I. Antiserumherstellung

Die Versuche zur Antiserumherstellung werfen eine Reihe von Fragen auf, die drei unterschiedliche Versuchsanstellungen erforderlich machten.

1. Erster Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung

Der erste Versuchsabschnitt hatte folgende Fragen zu beantworten:

a) ist ein nicht denaturiertes Ausgangsmaterial (unbehandeltes Neuform-Sojamehl) zur Antikörperproduktion gegen isoliertes Sojaeiweiß besser in der Lage als ein schon mehreren chemischen Prozessen unterzogenes Sojaprotein ?

b) Ist ein einheitliches Antigen nach der "Hitze-Alkali-Präzipitation" gegen hoch und niedrig erhitztes Sojaprotein gleichermaßen gut geeignet, oder ist eine getrennte Behandlung des Antigens auf 75°C bzw. 110°C für die Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen Sojaprotein günstiger ?

c) Welche Antigenmenge pro Versuchstier ist günstiger bezüglich Titerhöhe einerseits und Verträglichkeit andererseits: 7,5 g oder 15 g ?

d) Welche Menge des 10%ig zugesetzten Hilfsstoffes Aluminiumhydroxyd-Gel ist günstiger: 0,75 g oder 1,5 g ?

e) Welches Aluminiumpräparat ist als Hilfsstoff geeigneter: Ein als Adsorbens bekanntes, stabiles $Al(OH)_3$-Gel in flüssiger Form, oder ein $Al(OH)_3$-Gel in Pulverform ?

f) Hat das Geschlecht der Versuchstiere einen Einfluß auf den Verlauf und Erfolg der Immunisierung ?

g) Ist das Körpergewicht bzw. Alter der Versuchstiere von Bedeutung für Verlauf und Erfolg der Immunisierung ?

Material und Methodik des ersten Versuchsabschnitts

64 gesunde Versuchstiere, Kaninchenbastarde beiderlei Geschlechts, davon 52 mit einem Durchschnittsgewicht von 3 kg und 12 Tiere mit einem durchschnittlichen Gewicht von 4,5 bis 5 kg, wurden in 8 Gruppen à 8 Tieren aufgeteilt, von denen die ersten 4 jeder Gruppe unter Verwendung des Alu-Gel-S der Firma Serva und die nächsten 4 Tiere unter Verwendung von Aluminiumhydroxydgel Nr. 1088 der Firma Merck immunisiert wurden.

Die Gruppen 1, 3, 5,und 7 wurden mit Sojaprotein Promine-D der Central Soya Int. Inc. ohne Zusatz von Markierungsstoff Titandioxyd immunisiert.

Die Gruppen 2, 4, 6 und 8 wurden immunisiert mit einem naturbelassenen Reform-Sojavollmehl der Firma Hensel.

Zur Aufbereitung der Antigene wurde sowohl von Sojaprotein wie von Sojavollmehl eine 10%ige Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung im Starmix hergestellt und bei +4°C für 24 Stunden in den Kühlschrank verbracht. Danach wurde die Aufschwemmung 10 Min. mit 2000 g zentrifugiert. Der opalisierende Überstand wurde weiter verwendet.

Ein Teil dieses Extraktes wurde unerhitzt in Flaschen abgefüllt und lyophilisiert (Nativ-Extrakt).
Ein anderer Teil wurde für 30 Min. auf 75°C erhitzt (Degenkolb I), ein weiterer für 30 Min. bei 110°C autoklaviert (Degenkolb II).
Aus dem letzten Teil wurde ein "Hitze-Alkali-Präzipitin" nach W.A. SCHMIDT (1912) angefertigt. Dazu wurden die beiden Extrakte aus Sojaprotein bzw. aus Sojavollmehl für 30 Min. auf 70°C erhitzt, mit 15 % einer 1 n Natronlauge alkalisiert, nochmals 15 Min. auf 70°C erhitzt und mit 1 n Salzsäure wieder neutralisiert.

Der Hälfte der so aufbereiteten Antigene, Nativ-Extrakt, Degenkolb I, Degenkolb II und Hitze-Alkali-Präzipitin

wurde vor der Lyophilisation zu 1,5 % Aluminiumhydroxydgel Nr. 1088 der Firma Merck zugesetzt.
Die zweite Hälfte der Antigene wurde ohne Zusatz lyophilisiert und nach der Gefriertrocknung mit dem Serva-Alu-Gel-S, das als wäßriges Gel gehandelt wird, in der entsprechenden Konzentration kurz vor Gebrauch versetzt, und zwar 0,75 % zu Degenkolb I und II und 1,5 % zu Hitze-Alkali-Präzipitin und Nativ-Extrakt. Die niedrigere Antigen-Konzentration von Degenkolb I und II wurde durch die doppelte Menge Aqua destillata beim Auflösen erreicht.

Jedem Versuchstier wurde 15mal im Abstand von 2 Tagen je 10 ml der für seine Gruppe bestimmten Antigenlösung subcutan injiziert.

Vier Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere, die zwei Tage gehungert hatten, mit einem Genickschlag betäubt und durch Halsschnitt entblutet. Das Blut blieb bei Zimmertemperatur über Nacht stehen. Am folgenden Tag wurde das Serum durch Abgießen und durch Zentrifugieren gewonnen, steril filtriert und lyophilisiert.

Die folgende Aufstellung verdeutlicht die Versuchsanordnung des ersten Versuchsabschnitts.

Anordnung des ersten Versuchsabschnitts zur Antiserumherstellung:

Versuchstiergruppe		Ø-Gewicht	Hilfsstoff	Aufbereitung	Antigen
Gruppe 1	a	5 kg	Serva-Alu	Degenkolb I	Protein
	b	5 kg	Merck-Alu	Degenkolb I	Protein
Gruppe 2	a	5 kg	Serva-Alu	Degenkolb I	Mehl
	b	3 kg	Merck-Alu	Degenkolb I	Mehl
Gruppe 3	a	3 kg	Serva-Alu	Degenkolb II	Protein
	b	3 kg	Merck-Alu	Degenkolb II	Protein
Gruppe 4	a	3 kg	Serva-Alu	Degenkolb II	Mehl
	b	3 kg	Merck-Alu	Degenkolb II	Mehl
Gruppe 5	a	3 kg	Serva-Alu	Hitze-Alk-P	Protein
	b	3 kg	Merck-Alu	Hitze-Alk-P	Protein
Gruppe 6	a	3 kg	Serva-Alu	Hitze-Alk-P	Mehl
	b	3 kg	Merck-Alu	Hitze-Alk-P	Mehl
Gruppe 7	a	3 kg	Serva-Alu	Nativ-Extrakt	Protein
	b	3 kg	Merck-Alu	Nativ-Extrakt	Protein
Gruppe 8	a	3 kg	Serva-Alu	Nativ-Extrakt	Mehl
	b	3 kg	Merck-Alu	Nativ-Extrakt	Mehl

Als Kontrolle wurde vor Beginn des Versuchs von jedem Tier Blut entnommen und das Serum auf einen etwa schon vorhandenen Titer gegen Sojaprotein geprüft. Alle Tiere waren negativ. Bei einer Wiederholung der Kontrolle zeigte ein Tier eine schwach positive Reaktion und wurde demzufolge von der weiteren Immunisierung ausgeschlossen.

Keines der nach abgeschlossener Immunisierung gewonnenen Seren zeigte unspezifische Reaktionen gegenüber verdünntem Rinder- und Schweineserum sowie gegen Lösungen von Trockenblutplasma und aufgeschlossenem Milcheiweiß.

Ergebnisse des ersten Versuchsabschnitts

Die Ergebnisse des ersten Versuchsabschnitts wurden durch Titerüberprüfungen mittels der Ringpräzipitation ermittelt. Jedes Antiserum wurde mit Antigenlösungen steigender Verdünnungen vorsichtig überschichtet; diejenige Antigenverdünnung, die noch eine erkennbare Trübung an der Berührungsfläche von Antiserum und Antigenlösung hervorrief, wurde als der Titer des Serums gegen dieses Antigen bezeichnet. Das Antiserum wurde unverdünnt verwendet. Die Konzentration der Antigenlösungen wurde photometrisch überprüft. Die Verdünnung 1 : 1000, die die Stammverdünnung für die weiteren geometrischen Verdünnungen mit dem Faktor 2 darstellte, bedeutet den Gehalt von einem Teil Sojaprotein bzw. Sojamehl in tausend Teilen physiologischer Kochsalzlösung. Die Reaktion wurde nach 20 und nach 45 Minuten abgelesen. Als Antigene für die Titrierung der Antiseren wurden Sojamehl und isoliertes Sojaprotein in unerhitztem, gekochtem und autoklaviertem Zustand verwendet.

Im Laufe der Immunisierung fielen von den 64 Tieren des ersten Versuchsabschnitt. 14 Tiere aus. Davon hatten 8 Tiere einen anaphylaktischen Schock erlitten, der noch während oder unmittelbar nach der Injektion zum Tode führte. Die übrigen 6 Tiere mußten aus klinischen Gründen getötet werden oder wurden verendet aufgefunden. Es wurden

in diesen Fällen Untersuchungen der Tierkörper durchgeführt, deren Ergebnisse in den Tabellen 1 - 8 aufgeführt sind.

Die 8 Kaninchen einer Immunisierungsgruppe werden in Tabelle 1 - 8 mit den Zahlen 1 bis 4 bezeichnet. Sind die Immunisierungsgruppen 1 a und 1 b aufgeführt (siehe Tabelle 1), so lautet die Bezeichnung der zu ihnen gehörenden Versuchstiere: Ka 1a/1, Ka 1a/2, Ka 1a/3, Ka 1a/4 und Ka 1b/1, Ka 1b/2 Ka 1b/3 und Ka 1b/4.

Die beiden untersuchten Aluminiumhydroxydpräparate "Alu-Gel-S" der Firma Serva - Heidelberg und das Aluminiumhydroxydgel Nr. 1088 der Firma Merck - Darmstadt sind in der Tabelle 1 - 8 als a. (Serva-Alu) und b. (Merck-Alu) bezeichnet In der Spalte "Aufbereitung des Antigens" ist unter der Abkürzung "HAP" das sogenannte Hitze-Alkali-Präzipitin nach W.A. SCHMIDT (1912) zu verstehen, bei dessen Herstellung eine 45-minütige Erhitzung erfolgt; alle anderen Temperaturangaben in dieser Spalte beziehen sich auf eine Einwirkungszeit von 30 Min.

Tabelle 1

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräzipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 1a/1	20' 45'	1: 8000 1:16000	1: 4000 1: 8000	1: 2000	1: 4000	1: 4000	-	Protein	a	75°C
Ka 1a/2	20' 45'	1:32000 1:32000	1: 4000	1: 2000	-	-	-	Protein	a	75°C
Ka 1a/3	20' 45'	1: 8000 1:16000	1: 4000 1: 8000	1: 2000 1: 4000	1:32000	1: 1000 1: 2000	- 1: 1000	Protein	a	75°C
Ka 1a/4		nach der 6. s. c. Injektion anaphylaktischer Schock						Protein	a	75°C
Ka 1b/1	20' 45'	1: 8000 1:16000	1: 4000	1: 2000	1: 8000 1:16000	1: 2000 1: 8000	- -	Protein	b	75°C
Ka 1b/2	20' 45'	1: 8000 1:16000	1: 4000	1: 2000	1:32000 1:64000	1:16000 1:32000	1: 4000 1: 8000	Protein	b	75°C
Ka 1b/3	20' 45'	1: 8000	1: 4000	1: 2000	1:32000	1:16000 1:32000	1: 8000 1:16000	Protein	b	75°C
Ka 1b/4	20' 45'	1: 8000	1: 4000 1: 8000	1: 4000 1: 8000	1:32000 1:64000	1:16000 1:32000	1:16000 1:32000	Protein	b	75°C

a = Serva-Alu; b = Merck-Alu

Tabelle 2

Titerbestimmung mittels der Röhrchenprizipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 2a/1	20' 45'	1: 4000 1: 8000	1: 2000 1: 4000	1: 2000	1: 2000	- -	- -	Mehl	a	75°C
Ka 2a/2	20' 45'	1:16000	1: 4000 1: 8000	1: 2000 1: 8000	1: 8000 1:16000	1: 1000	-	Mehl	a	75°C
Ka 2a/3	20' 45'	1: 8000	1: 4000	1: 2000	-	-	-	Mehl	a	75°C
Ka 2a/4	20' 45'	1: 8000	1: 4000	1: 2000 1: 4000	1: 2000	-	-	Mehl	a	75°C
Ka 2b/1	nachträglich festgestellter positiver Anfangstiter des vor Versuchsbeginn zur Kontrolle entnommenen Serums, Tier aus dem Versuch ausgeschieden									
Ka 2b/2	nach der 6. s. c. Injektion (im Lendenbereich) Lähmung der Hinterhand. Fortan schlechte Futteraufnahme; verendete nach der 9. s. c. Injektion							Mehl	b	75°C
Ka 2b/3	20' 45'	1: 4000 1: 8000	1: 4000	1: 2000 1: 4000	- -	1: 1000	- -	Mehl	b	75°C
Ka 2b/4	20' 45'	1: 4000 1: 8000	1: 4000	1: 2000 1: 4000	- -	- -	- -	Mehl	b	75°C

a = Serva-Alu; b = Merck-Alu

Tabelle 3

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräzipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 3a/1		nach der 12. s.c. Injektion anaphylaktischer Schock						Protein	a	110°C
Ka 3a/2		nach der 13. s.c. Injektion anaphylaktischer Schock						Protein	a	110°C
Ka 3a/3	20'	1: 8000	1: 4000	1: 2000	-	1: 4000	1: 2000	Protein	a	110°C
	45'				-	1:16000	1: 8000			
Ka 3a/4		nach der 13. s.c. Injektion anaphylaktischer Schock						Protein	a	110°C
Ka 3b/1	20'	1: 8000	1: 4000	1: 2000	-	1: 8000	1: 4000	Protein	b	110°C
	45'				-	1:16000	1: 8000			
Ka 3b/2	20'	1: 4000	1: 4000		-			Protein	b	110°C
	45'	1:16000	1: 8000	1: 4000	1: 1000	1:16000	1: 8000			
Ka 3b/3	20'	1: 8000		1: 4000	1:32000	1:32000		Protein	b	110°C
	45'	1:16000	1: 8000	1:16000	1:64000	1:64000	1:32000			
Ka 3b/4	20'				-	1:16000	1: 8000	Protein	b	110°C
	45'	1:16000	1: 8000	1: 4000	1: 1000	1:32000	1:16000			

a = Serva-Alu; b= Merck-Alu

Tabelle 4

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräzipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 4a/1		nach der 11. s.c. Injektion anaphylaktischer Schock						Mehl	a	110°C
Ka 4a/2	20' 45'	1: 8000	1: 4000	1: 2000 1: 4000	1: 2000 1: 4000	- -	- -	Mehl	a	110°C
Ka 4a/3		nach der 11. s.c. Injektion anaphylaktischer Schock						Mehl	a	110°C
Ka 4a/4	20' 45'	1: 4000 1: 8000	1: 4000	1: 2000	- -	- -	- -	Mehl	a	110°C
Ka 4b/1		nach der 6. s.c. Injektion tot aufgefunden. Akute Pneumonie.						Mehl	b	110°C
Ka 4b/2	20' 45'	1: 4000 1: 8000	1: 4000	1: 2000 1: 4000	- -	1:16000	1: 4000 1: 8000	Mehl	b	110°C
Ka 4b/3		nach der 6. s.c. Injektion tot aufgefunden. Akute Pneumonie.						Mehl	b	110°C
Ka 4b/4		nach der 12. s.c. Injektion tot aufgefunden. Kokzidienbefall der Leber.						Mehl	b	110°C

a = Serva-Alu; b = Merck-Alu

Tabelle 5

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräzipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 5a/1	20'	1: 2000	1: 2000	1: 1000	1: 1000	-	-	Protein	a	HAP 70°C
	45'			1: 2000	1: 2000	1: 4000	1: 8000			
Ka 5a/2	20'	1: 2000	1: 2000	1: 2000		-	-	Protein	a	HAP 70°C
	45'		1: 4000	1: 4000	1: 2000	-	-			
Ka 5a/3	20'	1: 4000	1: 4000	1: 2000		-	-	Protein	a	HAP 70°C
	45'	1: 8000	1: 8000	1: 4000	1: 1000	1: 4000	-			
Ka 5a/4	20'	1: 4000	1: 2000	1: 4000	1: 2000	1:32000	1:16000	Protein	a	HAP 70°C
	45'		1: 4000		1: 4000		1:32000			
Ka 5b/1	20'	1: 4000	1: 4000	1: 2000	1:16000	1: 8000	1: 8000	Protein	b	HAP 70°C
	45'	1:16000	1: 8000	1: 8000	1:32000	1:16000	1:16000			
Ka 5b/2	20'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	-	-	-	Protein	b	HAP 70°C
	45'				1: 1000	1: 1000	-			
Ka 5b/3	20'	1: 2000	1: 2000	1: 2000	1:16000	1: 4000	1: 4000	Protein	b	HAP 70°C
	45'	1: 4000	1: 4000		1:64000	1:32000	1:16000			
Ka 5b/4	20'	1: 2000	1: 2000	1: 2000	-	-	-	Protein	b	HAP 70°C
	45'	1: 4000	1: 4000		1: 8000	1: 8000	-			

a = Serva-Alu; b= Merck-Alu
HAP = Hitze-Alkali-Präzipitin nach W.A.SCHMIDT

Tabelle 6

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräzipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 6a/1	20'	1: 2000	1: 1000	1: 2000	1: 1000	-	-	Mehl	a	HAP 70°C
	45'	1: 4000			1: 1000	-	-			
Ka 6a/2		nach der 12. s.c. Injektion anaphylaktischer Schock						Mehl	a	HAP 70°C
Ka 6a/3	20'	1: 2000	1: 1000	1: 2000	1: 1000	-	-	Mehl	a	HAP 70°C
	45'	1: 4000				-	-			
Ka 6a/4		nach der 7. s.c. Injektion anaphylaktischer Schock. Leber mit Kokzidien befallen.						Mehl	a	HAP 70°C
Ka 6b/1	20'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	-	-	-	Mehl	b	HAP 70°C
	45'				-	-	-			
Ka 6b/2	20'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	-	-	-	Mehl	b	HAP 70°C
	45'				-	-	-			
Ka 6b/3	20'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	-	-	-	Mehl	b	HAP 70°C
	45'	1: 8000	1: 4000	1: 4000	-	-	-			
Ka 6b/4	20'	1: 2000	1: 2000	1: 1000	-	-	-	Mehl	b	HAP 70°C
	45'	1: 4000	1: 4000	1: 2000	-	-	-			

a = Serva-Alu; b = Merck-Alu
HAP = Hitze-Alkali-Präzipitin nach W.A.SCHMIDT

Tabelle 7

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräzipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 7a/1	20'	1: 2000	1: 2000	1: 4000	1:16000	1: 1000	-	Protein	a	nativ
	45'				1:32000	1: 4000	-			
Ka 7a/2	20'	1: 4000	1: 4000	1: 2000	-	-	-	Protein	a	nativ
	45'				1: 1000	-	-			
Ka 7a/3	20'	1: 2000	1: 2000	1: 2000	1:16000	-	-	Protein	a	nativ
	45'				1:32000	-	-			
Ka 7a/4	20'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	1: 8000	-	-	Protein	a	nativ
	45'				1:32000	-	-			
Ka 7b/1	20'	1: 4000	1: 4000	1: 4000	1: 2000	-	-	Protein	b	nativ
	45'				1: 4000	-	-			
Ka 7b/2	20'	1: 4000	1: 4000	1: 2000	1: 8000	-	-	Protein	b	nativ
	45'			1: 4000	1:16000	-	-			
Ka 7b/3	20'	1: 2000	1: 2000	1: 2000	1:16000	-	-	Protein	b	nativ
	45'	1: 4000	1: 4000	1: 4000	1:32000	1: 1000	-			
Ka 7b/4	20'	1: 4000	1: 2000	1: 1000	1: 8000	-	-	Protein	b	nativ
	45'			1: 2000	1:16000	-	-			

a = Serva-Alu; b= Merck-Alu

Tabelle 8

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräsipitation der im 1. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 8a/1	20' 45'	1: 4000	1: 8000	1: 4000	1: 1000	- -	- -	Mehl	a	nativ
Ka 8a/2	20' 45'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	1:16000 1:32000	- 1: 1000	- -	Mehl	a	nativ
Ka 8a/3	20' 45'	1: 4000	1: 2000	1: 2000 1: 4000	- 1: 1000	- -	- -	Mehl	a	nativ
Ka 8a/4	20' 45'	1: 2000	1: 2000	1: 2000 1: 4000	- 1: 1000	- -	- -	Mehl	a	nativ
Ka 8b/1	20' 45'	1: 4000	1: 4000	1: 4000	1: 2000 1:16000	- -	- -	Mehl	b	nativ
Ka 8b/2	20' 45'	1: 2000 1: 4000	1: 2000	1: 4000	1: 1000	- -	- -	Mehl	b	nativ
Ka 8b/3		nach der 13. s.c. Injektion tot aufgefunden. Akute Pneumonie - Leberkapselriß						Mehl	b	nativ
Ka 8b/4	20' 45'	1: 4000	1: 2000 1: 4000	1: 2000 1: 4000	1: 8000 1:32000	1: 2000 1: 8000	1: 2000 1: 4000	Mehl	b	nativ

a = Serva-Alu; b = Merck-Alu

Anhand der in den Tabellen 1 - 8 aufgeführten Ergebnisse läßt sich die Fragestellung des ersten Versuchs zur Antiserumherstellung folgendermaßen beantworten:

a) Ein natives Ausgangsmaterial, in diesem Fall ein naturbelassenes Neuform-Sojavollmehl, ist zur Antikörperbildung gegen isoliertes Sojaprotein, wie es als Zusatzstoff zu Fleischwaren propagiert wird, wesentlich weniger gut geeignet als ein schon mehreren Reinigungsprozessen unterzogenes Sojaprotein, soweit es sich um erhitzte Testantigene handelt; in unerhitztem Zustand waren keine Unterschiede festzustellen.

   Bei der Stimulierung der Antikörperbildung war der Unterschied zwischen Sojamehl und Sojaprotein so eindeutig, daß zur Bewertung der Hitzespezifität der Antiseren (unter b) nur die mit Sojaprotein immunisierten Gruppen 1, 3, 5 u. 7 herangezogen wurden.

b) Ein einheitliches, mittels der "Hitze-Alkali-Präzipitation" aufbereitetes Antigen ist zur gleichzeitigen Antikörperbildung gegen hocherhitztes, gekochtes und rohes Sojaprotein in der Lage; jedoch entsprach dieser Erwartung im ersten Versuchsabschnitt nur die Hälfte der nach dieser Vorschrift hergestellten Antiseren.

   Bei getrennter Immunisierung mittels niedrig- und hocherhitztem Sojaprotein waren in den produzierten Antiseren zwar ausreichende Antikörpertiter gegen die entsprechenden homologen bzw. autologen Antigene festzustellen, doch waren bei Anwendung der getrennten Immunisierung gleichzeitig auch die meisten Ausfälle zu verzeichnen.

c) Die im ersten Versuchsabschnitt eingesetzten Antigenmengen pro Versuchstier von 7,5 g bzw. 15 g ließen keinen Unterschied in der erreichten Titerhöhe erkennen; die Verträglichkeit war in beiden Fällen gut (Gruppe 1 und 5).

d) Auch die verwendeten Mengen der beiden Hilfsstoffe von 0,75 g und 1,5 g wurden gut vertragen und ließen keinen Unterschied in der Wirksamkeit erkennen.

e) Bei gleicher Wirksamkeit und Verträglichkeit war das Aluminiumhydroxydpräparat Nr. 1088 (Firma Merck) vorzuziehen, da es dem Impfstoff bereits vor der Lyophilisierung zugesetzt werden konnte, als Trockensubstanz länger haltbar ist und einen geringeren Preis hat als die Vergleichssubstanz.

f) Das Geschlecht der Versuchstiere hatte im ersten Versuchsabschnitt keinen erkennbaren Einfluß auf die Ergebnisse.

g) Das Körpergewicht und Alter der Versuchstiere sind in doppelter Hinsicht von Bedeutung für den Verlauf und Erfolg der Immunisierung. Kaninchen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 5 kg scheinen den Streß von 15 Injektionen besser zu überstehen als leichtere und jüngere Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von 2,5 - 3 kg. Bei höherem Körpergewicht ist gleichzeitig eine höhere Serumausbeute zu erwarten.

Zweiter Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung

Der zweite Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung hatte die folgenden Fragen zu beantworten:

a) Ist die intravenöse Verabreichung kleiner Antigenmengen zur Antikörperproduktion gegen hocherhitztes Sojaprotein geeignet, und wie verhalten sich ihre Resultate zu denjenigen der Immunisierung mit großen Antigenmengen und subcutaner Verabreichung ?

b) Ist das komplette Freundsche Adjuvans in diesem Zusammenhang in der Lage, höhertitrige Seren zu erzeugen als die der vergleichbaren Gruppe 3 des ersten Versuchsabschnitts ?

c) Lassen sich durch den Einsatz eines genetisch möglichst einheitlichen Versuchstiermaterials die individuellen Unterschiede in der Antikörperbildung im Vergleich zur Verwendung von Bastarden verringern ?

d) Hat bei reinrassigen Versuchstieren das Geschlecht einen erkennbaren Einfluß auf den Verlauf und Erfolg der Immunisierung ?

Material und Methodik des zweiten Versuchsabschnitts

Für den zweiten Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung wurden 6 weibliche und 6 männliche rassereine "Weiße Neuseeländer"-Kaninchen mit hohem Verwandtschaftsgrad aus der Zucht der Zentralen Versuchstieranlage des Bundesgesundheitsamtes bezogen.

Vor Beginn des Versuchs wurden Kontrollen auf eventuell schon bestehende Titer gegen Sojaprotein durchgeführt, die bei allen Versuchstieren negativ verliefen.

Zu Beginn der Immunisierung wurden den Tieren je 10 mg von 15 Minuten auf 110°C erhitztem Sojaprotein Promine D in 1 ml physiol. NaCl aufgeschwemmt und mit 1 ml komplettem Freundschen Adjuvans gemischt an der Innenseite beider Hinterschenkel intrakutan injiziert. Nach 14-tägiger Ruhepause erfolgte dann eine 3-tägige Immunisierung: dabei wurde am 1. Tag jedem Tier 30 mg hocherhitztes Sojaprotein in 3 ml physiol. NaCl subcutan und am 2. und 3. Tag jeweils die gleiche Menge intravenös verabreicht.

Von den 12 eingesetzten Tieren fielen 2 Tiere im Laufe der Immunisierung aus, davon ein weibliches Tier nach der 1. intravenösen und ein männliches Tier nach der 2. intravenösen Injektion. Die Tiere wurden am nächsten Tag verendet aufgefunden; sie hatten während und unmittelbar nach der Injektion keine Anzeichen einer beginnenden anaphylaktischen Reaktion erkennen lassen.

Nach einer 10-tägigen Pause wurde bei den verbliebenen Versuchstieren die erste Blutentnahme zur Überprüfung des Serumtiters durchgeführt. Die Überprüfung zeigte jedoch, daß von keinem der untersuchten Tiere ein in der Ringpräzipitation erkennbarer Titer gegen Sojaprotein gebildet worden war.

Daraufhin wurde jedem Tier 50 mg hocherhitztes Sojaprotein in 5 ml physiol. NaCl intravenös verabreicht. Nach einem Zeitraum von 14 Tagen wurde erneut Blut entnommen und der Serumtiter mittels der Ringpräzipitation wie im 1. Versuch gegen rohes, gekochtes und bei 115°C autoklaviertes Sojaprotein und Sojamehl geprüft.

Tabelle 9

Titerbestimmung mittels der Röhrchenpräzipitation der im 2. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren

Vers. tier	Beob. zeit	S.mehl roh	S.mehl 15'100°C	S.mehl 15'115°C	S.protein roh	S.protein 15'100°C	S.protein 15'115°C	Antigen zur Immun.	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 9/1	nach der 1. intravenösen Injektion verendet aufgefunden. Todesursache akute Enteritis									
Ka 9/2	20'	1: 4000	1: 4000	1: 2000	-	-	1: 1000	Protein	Freund-sches Adjuvans komplett	110°C
	45'				-	-				
Ka 9/3	20'	1: 2000	1: 2000	1: 2000	-	-	1: 1000	"	"	"
	45'	1: 4000			-	-				
Ka 9/4	20'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	1:16000	1:16000	1:16000	"	"	"
	45'	1: 8000	1: 4000	1: 4000	1:64000	1:64000	1:64000			
Ka 9/5	20'	1: 4000	1: 4000	1: 1000	-	-	-	"	"	"
	45'			1: 4000	-	-	-			
Ka 9/6	20'	1: 4000	1: 2000	1: 2000	-	-	-	"	"	"
	45'	1: 8000	1: 4000	1: 4000	-	-	-			
Ka 9/7	nach der 2. intravenösen Injektion verendet aufgefunden. Untersuchung ergab starke Leberschwellung mit multiplen stecknadelkopfgroßen weißlichen Herden. Bakteriolog. und Parasitolog. neg.									
Ka 9/8	20'	1: 2000	1: 4000	1: 4000	-	-	-	"	"	"
	45'	1: 4000			-	-	-			
Ka 9/9	20'	1: 2000	1: 8000	1: 2000	1:16000	1: 8000	1: 2000	"	"	"
	45'	1: 4000			1:32000	1:16000	1: 8000			
Ka 9/10	20'	1: 1000	1: 4000	1: 1000	1: 8000	-	-	"	"	"
	45'	1: 4000		1: 4000	1:32000	1:16000	-			
Ka 9/11	20'	1: 4000	1: 4000	1: 1000	-	-	-	"	"	"
	45'	1: 8000		1: 4000	-	-	-			
Ka 9/12	20'	1: 2000	1: 8000	1: 2000	-	-	-	"	"	"
	45'	1: 4000		1: 4000	1: 8000	-	-			

Die Ergebnisse dieser 2. Überprüfung sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Zur sicheren Ausführung aller Injektionen im zweiten Versuchsabschnitt wurden die Kaninchen auf einem Operationstisch aufgebunden. Die Blutentnahmen zur Titerüberprüfung wurden mittels der Herzpunktion vorgenommen, da sich die kurzohrigen "Weißen Neuseeländer" Kaninchen zur Entnahme einer entsprechenden Blutmenge aus der Ohrvene weniger gut eignen.

Ergebnisse des zweiten Versuchsabschnitts zur Antiserumherstellung

Die Ergebnisse der Titerprüfungen der im zweiten Versuch erzeugten Antiseren sind in gleicher Anordnung wie für den ersten Versuch in Tabelle 9 aufgeführt. Die Bezeichnung der Versuchstiere erfolgte fortlaufend von Ka 9/1 bis Ka 9/12, wobei Ka 9/1 bis Ka 9/6 die sechs weiblichen und Ka 9/7 bis Ka 9/12 die sechs männlichen Tiere bezeichnet.

Der Untersuchungsbefund bzw. die vermutliche Todesursache der verendeten Tiere Ka 9/1 und Ka 9/7 ist auch hier in die Tabelle mit aufgenommen worden.

Die Tabelle 9 zeigt im wesentlichen ein ähnliches Bild wie die Tabellen 1 bzw. 8; wie dort ist auch hier festzustellen, daß die gewonnenen Immunseren stets mit Sojamehl reagieren. Die präzipitierenden Eigenschaften gegenüber ihrem eigentlichen, homologen Antigen, dem isolierten Sojaprotein, sind deutlich schlechter.

Anhand dieser Ergebnisse lassen sich die Fragen a bis d des zweiten Versuchsabschnitts zur Antiserumherstellung wie folgt beantworten:

a) Die intravenöse Verabreichung kleiner Antigenmengen ist zur Produktion von Antikörpern gegen hocherhitztes Sojaprotein sehr wohl in der Lage, wie das Serum von

Ka 9/4 beweist. Dieses Antiserum besitzt gute präzipitierende Eigenschaften gegenüber allen Erhitzungsstufen des Sojaproteins und eine ausreichende Reaktionsfähigkeit gegenüber Sojamehl. Trotz dieser Reaktionsbreite - wie übrigens bei allen grprüften Seren - ist die Spezifität gegenüber anderen Eiweißkörpern hoch.

Leider weist im zweiten Versuch neben Serum 9/4 nur noch Serum 9/9 ausreichende präzipitierende Eigenschaften gegenüber Sojaprotein auf. Alle übrigen Seren sind von für diagnostische Untersuchungen ungeeignet bzw. zeigen überhaupt keine in der Ringpräzipitation erkennbare Reaktion.

Die Antiserumherstellung gegen Sojaprotein mittels der intravenösen Immunisierung ist in der hier durchgeführten Dosierung des Antigens weniger für die Zwecke der Fremdeiweißdiagnostik geeignet als die im ersten Versuch durchgeführte subcutane Methode.

b) Die Frage nach dem Einfluß des Freundschen Adjuvans auf die erreichte Titerhöhe läßt sich durch den ungünstigen Ausgang des zweiten Versuchs mit nur einem brauchbaren Serum nicht beantworten.

c) Durch die Verwendung eines weitgehend einheitlichen Versuchstiermaterials läßt sich die individuelle Streuung in der Intensität der Antikörperbildung nicht beeinflussen.

d) Das Geschlecht der Versuchstiere ließ auch im zweiten Versuch keinen Einfluß auf Verlauf und Erfolg der Immunisierung erkennen.

Dritter Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung

Nachdem im ersten Versuchsabschnitt die Frage ungeklärt geblieben war, welcher der beiden Antigenaufbereitungen zur Herstellung eines Antiserums gegen isoliertes Sojaprotein der Vorzug zu geben sei - der Immunisierung mit dem "Hitze-Alkali-Präzipitin" nach W.A. SCHMIDT (1912) oder der getrennten Immunisierung mit niedrigerhitztem und autoklaviertem Sojaprotein - sollte im dritten Versuchsabschnitt eine erneute Gegenüberstellung dieser beiden Methoden erfolgen, um schließlich ein Antiserum bzw. Antiserumgemisch in ausreichender Menge und Qualität zu gewinnen, das die Erfassung des Fremdeiweißes in allen üblichen Erhitzungsstufen ermöglichen sollte.

Material und Methodik des dritten Versuchsabschnitts

In der Fremdeiweißserologie werden vorwiegend Antiseren zum Nachweis vom Fremdeiweiß in gekochtem bzw. autoklaviertem Material benötigt. Der Nachweis in rohem und niedrig erhitztem Material bereitet weniger Schwierigkeiten und nimmt einen geringeren Raum ein. Diese Tatsache wurde beim Ansatz der Versuchstierzahl für die getrennte Immunisierung berücksichtigt, indem für die Gewinnung von Antiserum gegen hocherhitztes Sojaprotein die doppelte Anzahl Kaninchen gegenüber der Immunisierung gegen niedrig erhitztes Sojaprotein eingesetzt wurde.

30 Kaninchen, Bastarde unterschiedlichen Geschlechts, mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 4 kg, wurden in drei Gruppen aufgeteilt, davon zwei Gruppen mit je zwölf und eine Gruppe mit sechs Tieren.

Die erste Gruppe mit zwölf Tieren (Gruppe 10) wurde mit einer 10%igen Aufschwemmung von Sojaprotein Promine D immunisiert, die zentrifugiert und filtriert und nach der Vorschrift der "Hitze-Alkali-Präzipitation" nach W.A. SCHMIDT (1912) aufbereitet worden war, wie bereits für den

ersten Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung ausführlich beschrieben worden ist.

Die zweite Gruppe mit zwölf Tieren (Gruppe 11) wurde mit einer 5%igen Aufschwemmung von Sojaprotein Promine D immunisiert, die nach Zentrifugieren und Filtrieren 30 Min. auf 110°C erhitzt worden war und die dritte Gruppe (Gruppe 12) mit sechs Tieren wurde mit der gleichen Aufschwemmung immunisiert, die nach Zentrifugieren und Filtrieren 30 Min. auf 75°C erhitzt worden war. Eine ausführliche Darstellung dieser getrennten Antigenaufbereitung nach DEGENKOLB (1967) wurde ebenfalls bereits im ersten Versuchsabschnitt gegeben.

Dem Antigen der ersten Gruppe (Gruppe 10) wurde als Hilfsstoff $Al(OH)_3$-Gel Nr. 1088 der Fa. Merck in einer Konzentration von 1,5% zugesetzt, während den Antigenen für die zweite und dritte Gruppe (Gruppe 11 und 12) derselbe Hilfsstoff, jedoch nur in einer Konzentration von 0,75% zugesetzt wurde.

Im Gegensatz zum ersten Versuchsabschnitt wurden die Antigene für alle 30 Tiere dieses Versuches nicht lyophilisiert, sondern vor jeder Injektion frisch bereitet.

Die Tiere erhielten 15mal alle 2 Tage je 10 ml der Antigenaufbereitung, 4 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet bzw. eine Probeentnahme vorgenommen und das Serum von jedem Tier getrennt gewonnen.

Ergebnisse des dritten Versuchsabschnitts

Der dritte Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung konnte ohne Ausfälle beendet werden.

Die Ergebnisse wurden auch hier durch Titerbestimmungen mittels der Ringpräzipitation gewonnen und in Tabelle 10 bis 12 aufgeführt.

Tabelle 10

Titerüberprüfung mittels der Ringpräzipitation der im 3. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren der Gruppe 10

Vers.tier Nr.	Beob. zeit	S.protein 15' 70°C	S.protein 15' 100°C	S.protein 15' 115°C	Hilfsst.zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 10/1	20'	1 : 64000	1 : 32000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/2	20'	1 : 64000	1 : 64000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/3	20'	1 : 64000	1 : 64000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/4	20'	1 : 32000	1 : 64000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/5	20'	1 : 32000	1 : 64000	1 : 16000	b	HAP
Ka 10/6	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/7	20'	1 : 32000	1 : 16000	1 : 8000	b	HAP
Ka 10/8	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/9	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/10	20'	1 : 32000	1 : 64000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/11	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 32000	b	HAP
Ka 10/12	20'	1 : 64000	1 : 64000	1 : 32000	b	HAP

b = Merck-Alu HAP = Hitze-Alkali-Präzipitin nach W.A.SCHMIDT

Tabelle 11

Titerüberprüfung mittels der Ringpräzipitation der im 3. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren der Gruppe 11

Vers.tier Nr.	Beob. zeit	S.protein 15' 70°C	S.protein 15' 100°C	S.protein 15' 110°C	S.protein 15' 120°C	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 11/1	20'	1 : 8000	1 : 16000	1 : 16000	1 : 16000	b	30' 110°C
Ka 11/2	20'	1 : 16000	1 : 32000	1 : 32000	1 : 8000	b	30' 110°C
Ka 11/3	20'	1 : 16000	1 : 16000	1 : 32000	1 : 8000	b	30' 110°C
Ka 11/4	20'	1 : 8000	1 : 16000	1 : 16000	1 : 8000	b	30' 110°C
Ka 11/5	20'	1 : 2000	1 : 8000	1 : 8000	-	b	30' 110°C
Ka 11/6	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 32000	1 : 32000	b	30' 110°C
Ka 11/7	20'	-	-	-	-	b	30' 110°C
Ka 11/8	20'	1 : 8000	1 : 16000	1 : 32000	1 : 64000	b	30' 110°C
Ka 11/9	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 32000	1 : 64000	b	30' 110°C
Ka 11/10	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 16000	1 : 32000	b	30' 110°C
Ka 11/11	20'	1 : 64000	1 : 64000	1 : 8000	1 : 16000	b	30' 110°C
Ka 11/12	20'	1 : 8000	1 : 16000	1 : 4000	1 : 4000	b	30' 110°C

b = Merck-Alu

Tabelle 12

Titerüberprüfung mittels der Ringpräzipitation der im 3. Versuchsabschnitt gewonnenen Antiseren der Gruppe 12

Vers.tier Nr.	Beob. zeit	S.protein 15' 70°C	S.protein 15' 100°C	S.protein 15' 110°C	S.protein 15' 120°C	Hilfsst. zur Immun.	Aufber. des Antigens
Ka 12/1	20'	-	-	-	-	b	30' 70°C
Ka 12/2	20'	1 : 32000	1 : 32000	-	-	b	30' 70°C
Ka 12/3	20'	1 : 32000	1 : 32000	1 : 4000	-	b	30' 70°C
Ka 12/4	20'	1 : 8000	-	-	-	b	30' 70°C
Ka 12/5	20'	1 : 8000	-	-	-	b	30' 70°C
Ka 12/6	20'	1 : 16000	1 : 8000	1 : 4000	-	b	30' 70°C

b = Merck-Alu

Anhand der in den Tabellen 10 - 12 aufgeführten Ergebnisse läßt sich feststellen, daß ein einheitliches Antigen, das nach der "Hitze-Alkali-Präzipitation" aufbereitet worden ist, bei allen zwölf untersuchten Tieren (Tab. 10) in der Lage war, ausreichende Antikörperbildung gegen alle geprüften Erhitzungsstufen von Sojaprotein zu induzieren.

Die getrennte Immunisierung gegen hocherhitztes (Tab. 11) und niedrigerhitztes (Tab. 12) Sojaprotein vermochte ebenfalls ausreichende Ergebnisse zu erzielen. Die gegen hocherhitztes Promine D hergestellten Seren in Tab. 11 zeigten auch gegen niedrigerhitztes Material deutliche Reaktionen, während die Seren gegen niedrigerhitztes Sojaprotein in Tab. 12 im wesentlichen nur mit ihrer homologen Erhitzungsstufe und in der Hälfte der Fälle mit gekochtem Material reagierten. Die Tiere Ka 12/1 und Ka 11/7 bildeten keine in der Ringpräzipitation meßbaren Antikörpermengen.

Die Fragestellung des dritten Versuchsabschnitts zur Antiserumherstellung gegen Sojaprotein läßt sich wie folgt beantworten:
Die Immunisierung mit einem einheitlichen Antigen, das nach der "Hitze-Alkali-Präzipitation" nach W.A. SCHMIDT (1912) aufbereitet wurde, ist der Immunisierung mit verschieden hoch erhitzten Antigenen nach DEGENKOLB (1967) der einfacheren Durchführung und der gleichmäßigeren Ergebnisse wegen vorzuziehen.

II. Versuche zur Titerbestimmung mit Hilfe der indirekten Hämagglutination (i.H.)

Die Bestimmung des Antikörpertiters mit Hilfe der Ringpräzipitation wie sie im Kapitel "Antiserumherstellung" beschrieben wurde, ist in der Lage, ohne großen Aufwand an Material und Zeit Auskunft über die präzipitierenden Eigenschaften eines Antiserums zu geben. Diese Methode eignet sich sowohl zur Feststellung der Quantität als auch

der Qualität der gebildeten Antikörper. Der Eintritt einer positiven Reaktion läßt sich hierbei aber nur an einer mit unbewaffnetem Auge erkennbaren Ausfällung von Eiweiß ablesen. Tritt eine solche Ausfällung in einer bestimmten Zeitspanne, z.B. innerhalb von 20 Min., nicht ein, so muß angenommen werden, daß keine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat. Verlängert man die Beobachtungszeit, kann jedoch häufig noch eine positive Reaktion beobachtet werden.

Ein System wie das der i.H., das auch makroskopisch nicht erkennbare Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar macht, und zudem eine Reaktionszeit von mehreren Stunden aufweist, müßte in der Lage sein, zusätzliche Aufschlüsse über die Eigenschaften eines Antiserums zu geben.

Aus diesem Grunde und um geeignete Antiseren für den Nachweis von Sojaprotein in Fleischwaren mit Hilfe der i.H. zu finden, wurden die im ersten Versuchsabschnitt zur Antiserumherstellung gewonnenen Antiseren von Ka 1 a/1 bis Ka 8 b/3 einer Bestimmung ihres Hämagglutinationstiters unterzogen. Die Versuche zur Titerbestimmung mit Hilfe der i.H. hatten die folgenden Fragen zu beantworten:

a) Welche Beziehung besteht zwischen den Ergebnissen der Titerüberprüfung mit der Ringpräzipitation und den mit der indirekten Hämagglutination (i.H.) erhaltenen Ergebnissen ?

b) Sind die Ergebnisse einer Titerüberprüfung mit der i.H. bei konstanten Arbeitsbedingungen und gleichem Material reproduzierbar ?

Material und Methodik

50 Antiseren, die im ersten Abschnitt der Versuche zur Antiserumherstellung gewonnen und sofort lyophilisiert worden waren, wurden mit der i.H. nach BOYDEN (1951) in der

Modifikation von KOTTER und HERRMANN (1968) auf ihren Antikörpertiter gegen Sojaprotein Promine D untersucht.

Um die Reproduzierbarkeit der Titerbestimmungen mit der i.H. zu überprüfen, wurden 20 dieser Antiseren dreimal innerhalb 4 Wochen einer Bestimmung ihres Antikörpertiters gegen Sojaprotein Promine D unterzogen. Wie bei den übrigen Versuchen wurden auch hier nur Erythrozyten desselben Hammels benutzt.

Von drei Hammeln wurden vor Beginn der Untersuchungen Erythrozyten gewonnen und in zehn Versuchsansätzen auf ihre mechanische Widerstandsfähigkeit während des Zentrifugierens und der Tanninbehandlung sowie auf ihre Fähigkeit zur Sensibilisierung mit Sojaprotein vergleichend geprüft. Die so vorbehandelten Erythrozyten wurden mit einem Anti-Sojaprotein-Serum vom Kaninchen agglutiniert. In der Kontrolle (physiol. NaCl) traten keine Agglutinationen auf. Derjenige Hammel, dessen Erythrozyten in den 10 Ansätzen die besten Ergebnisse brachten, wurde für alle nachstehend beschriebenen Hämagglutinationen als Blutspender herangezogen.

Das Hammelblut wurde aus der Vena jugularis nach Desinfektion der Hautoberfläche mit einer sterilen Kanüle entnommen, in einer sterilen Schüttelflasche mit Glasperlen aufgefangen, bis zum Erkalten geschüttelt und durch einen Faltenfilter (Schleicher u. Schüll Nr. 520 b 1/2) in ein 100 ml Zentrifugenglas überführt. Das defibrinierte und filtrierte Blut wurde dann mit 2000 g 10 Min. zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Erythrozytensediment wurde anschließend mit neutraler physiol. NaCl wieder aufgeschwemmt, wieder bei 2000 g 10 Min. zentrifugiert und der leicht hämolytische Überstand abgesaugt. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Wenn nach dem zweiten Waschen mit physiol. NaCl der Überstand noch deutliche Anzeichen von

Hämolyse zeigte, wurden die Erythrozyten als ungeeignet verworfen. Geeignete Erythrozyten zeigten nach der dritten Wäsche einen farblosen Überstand.

Nach der letzten Wäsche wurde das Erythrozytensediment für 12 h bei 3°C im Kühlschrank stehengelassen. Eine 0,5 %ige Aufschwemmung von Sojaprotein Promine D in neutraler physiol. NaCl wurde mit dem Ultra-Turrax gründlich homogenisiert und ebenfalls für 12 h bei 3°C in den Kühlschrank verbracht.

5 ml des Erythrozytensediments wurden mit 17,5 ml neutraler physiol. NaCl versetzt und 2,5 ml einer 0,1 %igen frisch bereiteten Tanninlösung tropfenweise unter Umschütteln zugegeben. Das Gemisch wurde nach 15 Min. schonend zentrifugiert, der hämolytische Überstand abgesaugt und das Erythrozytensediment dreimal bzw. so oft mit neutraler physiol. NaCl gewaschen, bis der Überstand farblos blieb. Das Sediment der tanninisierten Erythrozyten wurde danach mit Kochsalzlösung auf 25 ml aufgefüllt.

Die 0,5 %ige Aufschwemmung von Sojaprotein wurde bei 2000 g 10 Min. zentrifugiert und der opalisierende Überstand mit 10 Vol % der gewaschenen aber unbehandelten Erythrozyten versetzt. Nach 10 Min. bei Zimmertemperatur wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und 5 ml der überstehenden, von unspezifischen Hämagglutinen befreiten Sojaproteinlösung mit 5 ml öder Aufschwemmung tanninbehandelter Erythrozyten gemischt. Diese Mischung wurde in einem Reagenzglas für 2 h bei 37°C in den Brutschrank verbracht. Danach wurden die sensibilisierten Erythrozyten abzentrifugiert und dreimal mit neutraler physiol. NaCl gewaschen. Nach der dritten Wäsche wurde das Sediment der sensibilisierten Erythrozyten mit physiol. NaCl auf 20 ml aufgefüllt.

In der Zwischenzeit wurden die zu testenden Antiseren 30 Min. bei 56°C im Wasserbad inaktiviert und nach dem Abkühlen mit 10 Vol.% des gewaschenen, unbehandelten Erythrozytensediments versetzt. Nach Abzentrifugieren wurde jedem Antiserum noch-

mals 10 Vol.% gewaschener, unbehandelter Erythrozyten zugesetzt ohne die bereits vorher abzentrifugierten dabei wieder aufzuschütteln; dieser Arbeitsgang wurde noch ein drittes Mal wiederholt.

Für jedes so behandelte Antiserum wurde eine Reagenzglasreihe vorbereitet und in jedes Glas 0,5 ml physiol. NaCl vorgelegt. Von jedem Antiserum wurden 0,5 ml mit den 0,5 ml physiol. NaCl im ersten Röhrchen gemischt und 0,5 ml dieser Mischung in das nächste Röhrchen übertragen. Auf diese Weise entstand eine geometrische Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2, beginnend bei 1 : 2 im ersten Röhrchen.

In jedes Röhrchen der Verdünnungsreihe wurden 2 Tropfen der auf 20 mal aufgefüllten sensibilisierten Erythrozytenaufschwemmung gegeben, gründlich aufgeschüttelt und 1 h bei 37°C im Brutschrank gehalten.

Die Gläschen wurden danach erneut aufgeschüttelt und die Reaktion konnte nach weiteren 3 Stunden abgelesen werden.

Bei eingetretener Agglutination sedimentierten die Erythrozyten mehr oder weniger teppichförmig an den Boden des Glases. Ein scharf umrissenes, knopfförmiges Sediment in der Mitte des Reagenzglasbodens zeigte dagegen einen negativen Ausfall der Reaktion an, bei dem keine Agglutination erfolgt war. Alle Übergänge zwischen diesen beiden Sedimentformen sowie die Abstufung in der Stärke der eingetretenen positiven Reaktion wurde am Vorhandensein bzw. der Größe der gebildeten Erythrozytenagglutinate nach vorsichtigem Aufwirbeln des Sediments beurteilt. Zweifelhafte Ausfälle wurden in den folgenden Versuchen als negativ gewertet. Als Hämagglutinationstiter eines Antiserums ist diejenige höchste Stufe der Serum-Kochsalzlösung-Verdünnungsreihe zu verstehen, die noch eine positive Hämagglutinationsreaktion wie Teppichbildung und/oder Erythrozytenagglutinate im aufgeschüttelten Sediment erkennen ließ.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Titerbestimmungen mittels der i.H. sind in den Tabellen 13 bis 15 zusammengefaßt. Um den Vergleich mit den Ergebnissen der Titerbestimmungen mittels der Ringpräzipitation aus dem ersten Versuch zur Antiserumherstellung zu erleichtern, sind die entsprechenden Titer der Seren gegen rohes Sojaprotein mit aufgeführt worden. Die für die Serumspender gewählten Bezeichnungen sind für die entsprechenden Antiseren unter Weglassung der Tiergattungsbezeichnung Ka (Kaninchen) übernommen worden.

Tabelle 13

Vergleich der Titerbestimmungen mit indirekter Hämagglutination (i.H.) und Ringpräzipitation

Serum Nr.	Titer in der i.H. 1 :	Titer in der Ringpräzipitation gegen S.-protein,roh 1 :	Serum Nr.	Titer in der i.H. 1 :	Titer in der Ringpräzipitation gegen S.-protein,roh 1 :
1 a/1	256	4 000	3 a/3	64	-
1 a/2	4	-	3 b/1	-	-
1 a/3	2 000	32 000	3 b/2	-	-
1 b/1	-	8 000	3 b/3	-	32 000
1 b/2	128	32 000	3 b/4	-	-
1 b/3	64	32 000	4 a/2	256	2 000
1 b/4	4 000	32 000	4 a/4	2	-
2 a/1	-	2 000	4 b/2	16	-
2 a/2	256	8 000	5 a/1	16	1 000
2 a/3	8	-	5 a/2	128	2 000
2 a/4	64	2 000	5 a/3	500	1 000
2 b/3	32	-	5 a/4	256	2 000
2 b/4	64	-	5 b/1	8 000	16 000

Tabelle 14

Vergleich der Titerbestimmungen mit indirekter Hämagglutination (i.H. und Ringpräzipitation

Serum Nr.	Titer in der i.H. 1 :	Titer in der Ringpräzipitation gegen S.-protein,roh 1 :	Serum Nr.	Titer in der i.H. 1 :	Titer in der Ringpräzipitation gegen S.-protein,roh 1 :
5 b/2	64	-	7 b/1	1 000	2 000
5 b/3	1 000 000	16 000	7 b/2	4 000	8 000
5 b/4	128	-	7 b/3	64 000	16 000
6 a/1	16	1 000	7 b/4	64 000	8 000
6 a/2	128	1 000	8 a/1	128	1 000
6 b/1	1 000	-	8 a/2	2 000	16 000
6 b/2	8 000 000	-	8 a/3	8	-
6 b/3	1 000	-	8 a/4	8	-
6 b/4	32	-	8 b/1	256	2 000
7 a/1	500 000	16 000	8 b/2	128	1 000
7 a/2	8	-	8 b/4	1 000	8 000
7 a/3	16 000	16 000			
7 a/4	500 000	8 000			

Aus den Tabellen ist zunächst ersichtlich, daß der überwiegende Teil der Antiseren Hämagglutinationstiter unter 1 : 1000 aufweist. Dieser Bereich ist mit der Ringpräzipitation in der gewählten Anordnung nicht zu erfassen. Andererseits erreicht eine Reihe der untersuchten Antiseren in der i.H. Titerstufen, die mit der Ringpräzipitation in keinem der geprüften Fälle zu erreichen waren.

Der höchste Titer in der Ringpräzipitation betrug 1 : 32000 bzw. 1 : 64000 nach verlängerter Beobachtungszeit (1 b/2, 1 b/4, 3 b/3); der höchste Hämagglutinationstiter betrug 1 : 8 000 000 (6 b/2).

In den Tabellen 12 und 14 finden sich Titerangaben, die keine eindeutige Beziehung zwischen den Ergebnissen beider Methoden erkennen lassen; so weisen die Seren 1 a/2, 2 a/3, 2 b/3 und 4 a/4, die in der Ringpräzipitation keine Reaktion mit rohem Sojaprotein Promine D erkennen ließen, auch in der i.H. nur unbedeutende Titerhöhen auf. Andererseits erwiesen sich Seren wie 5 b/3, 7 a/1, 7 a/3 und 7 b/3, die in der Ringpräzipitation gegen rohes Sojaprotein gute Reaktionen gezeigt hatten, auch bei der Überprüfung mit der i.H. als brauchbar.

Als Gegenbeispiel können die Seren 1 b/3 und 3 b/3 dienen, die in der Ringpräzipitation gute Antikörpertiter aufwiesen. Für die i.H. mußten sie jedoch als unbrauchbar bezeichnet werden, da sie keinen oder nur einen geringen Hämagglutinationstiter zeigten. Ein weiteres Gegenbeispiel, allerdings in umgekehrter Anordnung, ist das Serum 6 b/2; es hatte unter den Seren in Tabelle 13 und 14 den höchsten Hämagglutinationstiter; dasselbe Serum zeigte aber in der Titerbestimmung mit der Ringpräzipitation keinen erkennbaren Antikörpertiter.
Betrachtet man die Titer einer Gruppe von Antiseren, die mit gleichem Antigen hergestellt worden sind (Seren der Gruppe 8 (8 a/1, 8 a/2, 8 a/3, 8 a/4, 8 b/1, 8 b/2 und 8 b/4), so ist ein direkter Zusammenhang in der Einstufung

dieser Seren nach ihrem Titer in der Ringpräzipitation und in der i.H. durchaus vorhanden. Dieser Zusammenhang ist in der Gruppe 8 besonders deutlich ausgeprägt. Die Einstufung vom besten zum schlechtesten Antiserum dieser Gruppe ist in beiden Fällen die gleiche:

8 a/2, 8 b/4, 8 b/1, 8 b/2, 8 a/3 und 8 a/4.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Titerbestimmungen mit der i.H. sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tabelle 15

Reproduzierbarkeit der Titerbestimmungen mit der indirekten Hämagglutination

Serum Nr.	Titer in der 1.Überprüfung 1 :	Titer in der 2.Überprüfung 1 :	Titer in der 3.Überprüfung 1 :
1 b/3	64	256	500
1 b/4	4 000	128 000	2 000 000
3 b/1	-	-	16
3 b/2	-	-	-
3 b/3	-	-	16 000
3 b/4	-	256	4 000
5 a/2	128	32	-
5 a/3	500	16	16
5 a/4	256	64	16
5 b/1	4 000	256	64
5 b/2	64	32	16
6 b/1	1 000	8	-
6 b/3	1 000	32	8
6 b/4	32	2	-
7 a/1	500 000	16 000 000	8 000
7 a/2	8	1	-
7 a/3	16 000	128	16
7 a/4	500 000	16 000 000	256
7 b/1	1 000	4	2
7 b/2	4 000	16	4

In Tabelle 15 sind die Hämagglutinationstiter von drei aufeinanderfolgenden Untersuchungen nebeneinander aufgeführt.

Wie ein Vergleich zeigt, hat sich nur in einem Fall (Serum 3 b/2) in allen drei Überprüfungen dasselbe Resultat ergeben. Dieses Serum war in keinem der 3 Ansätze in der Lage, mit rohem Promine D sensibilisierte Erythrozyten zu agglutinieren.

Bei sieben der geprüften 20 Antiseren ist in der 2. oder 3. i.H. ein Titeranstieg gegenüber der 1. i.H. zu verzeichnen, in 13 Fällen ist dagegen ein Titerabfall gegenüber der 1. i.H. festzustellen.

Die in der ersten Überprüfung hervorragenden beiden Seren (7 a/1 und 7 a/4) stehen auch in der zweiten Überprüfung an der Spitze der 20 untersuchten Seren. Sie weisen jedoch gegenüber der 1. Überprüfung einen Titeranstieg von 5 Stufen auf. In der 3. Überprüfung liegen die Titer dieser beiden Seren um 11 (7 a/1) und um 15 Stufen unter ihrem in der 2. Überprüfung festgestellten Titer.

Es sind also starke Titerschwankungen (Anstiege und Abfälle) über den gesamten Bereich der Verdünnungsreihe zu beobachten.

Die eingangs gestellten Fragen nach der Beziehung zwischen den Ergebnissen der Titerüberprüfungen mit der Ringpräzipitation und mit der i.H. und nach der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, die in der Titerüberprüfung mit der i.H. gewonnen worden waren, lassen sich wie folgt beantworten:

a) Gleiche Titerangaben in Ringpräzipitation und i.H. sind nicht vergleichbar. Ein mit der Ringpräzipitation festgestellter hoher Antikörpertiter eines Serums läßt nicht ohne weiteres auf einen hohen Titer in der i.H. schließen. Für die umgekehrte Anordnung gilt Entsprechendes. Weisen jedoch zwei Antiseren in der Ringpräzipitation einen deutlichen Unterschied in der Titerhöhe auf, so wird das bessere Antiserum mit größter Wahrscheinlichkeit

auch in der i.H. eine höhere Titerstufe erreichen.

b) Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Titerbestimmungen mit der indirekten Hämagglutination erscheint nicht gesichert (Tabelle 15).

III. Quantitative Bestimmung von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen

Zu einer quantitativen serologischen Bestimmung von Fremdeiweißzusätzen werden in jedem Fall - sei es bei der mißbräuchlichen Verwendung sogenannter zugelassener Fremdeiweiße, sei es bei der verbotswidrigen Verwendung nicht zugelassener Fremdeiweiße - Vergleichserzeugnisse benötigt, deren tatsächlicher Fremdeiweißgehalt den technologisch günstigsten und üblichen Prozentsätzen entspricht sowie über- und unterschreitet. Derartige Vergleichserzeugnisse müssen in Erhitzungsgrad und Zusammensetzung möglichst eng den zu untersuchenden Waren angepaßt sein. Nur einander weitgehend ähnliche Erzeugnisse können von unkalkulierbaren Nebenwirkungen unbeeinflußte Resultate geben.

1. Modellfleischwarenherstellung

Die Menge des in Modellfleischwaren verarbeiteten Fremdeiweißes kann bezogen werden

a) auf das frische Füllgut oder
b) die verwendete Fleisch- und Fettmenge.

Anordnung a) hat den Vorteil, daß sie in der Herstellung weder auf die Zugabe von Fremdwasser, noch auf den Wassergehalt des verarbeiteten Fleisches Rücksicht zu nehmen braucht. Sie eignet sich besonders zur Einarbeitung in die Methodik des Nachweises und zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit einer Nachweismethode.

Anordnung b) hat den Vorteil, in der Herstellung der Modellfleischwaren den Vorschriften der Fleisch-VO zu folgen, die eine Zugabe und Deklaration z.B. von Milcheiweiß in Gewichtsprozenten der verwendeten Fleisch- und Fettmenge fordert.

Mit Hilfe dieser Anordnung lassen sich im Gegensatz zu a) für entsprechende Waren des freien Handels Vergleichswaren herstellen.

Für die nachstehend beschriebenen Untersuchungen wurde die Anordnung a) gewählt. Zu rohem Bockwurstbrät aus der Produktion einer Berliner Fleischwarenfabrik wurde titandioxydmarkiertes Sojaprotein Promine D (Central Soya Inc.) in Konzentrationen von 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,75 %, 1 % 1,5 %, 2 %, 3 % und 4 % zugegeben. Zu diesem Zweck wurden zwei im Kutter hergestellte Vormischungen von 0,5 % und 4 % mit entsprechenden Mengen fremdeiweißfreien Brätes von Hand sorgfältig zu den angegebenen Endmischungen verarbeitet.
Die fertigen Mischungen wurden in gekennzeichnete Dosen à 160 g 73/58 DIN 14 abgefüllt und in vier getrennten Chargen im Labor-ROTOMAT (Fa. Stock) mit Standsterilisation auf 75°C, 100°C, 110°C und 120°C erhitzt. Je eine Dose im Zentrum und eine an der Peripherie des Käfigs war mit einem Thermofühler versehen, der die Dosenkerntemperatur an ein Meßgerät (Fa. Ellab, Kopenhagen) übermittelte; zwei weitere Thermofühler übermittelten die Wassertemperatur im Unterkessel.

Die Abbildungen 1 bis 4 geben den Temperaturverlauf während der vier Erhitzungsgänge wieder.

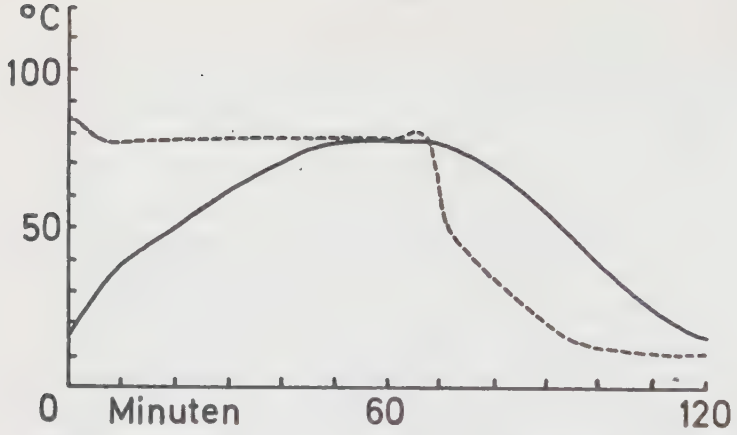


Abb. 1 Temperaturverlauf bei der Herstellung der Modellbrühwurst 75°

——— Dosenkerntemperatur
- - - - - - - - Wassertemperatur

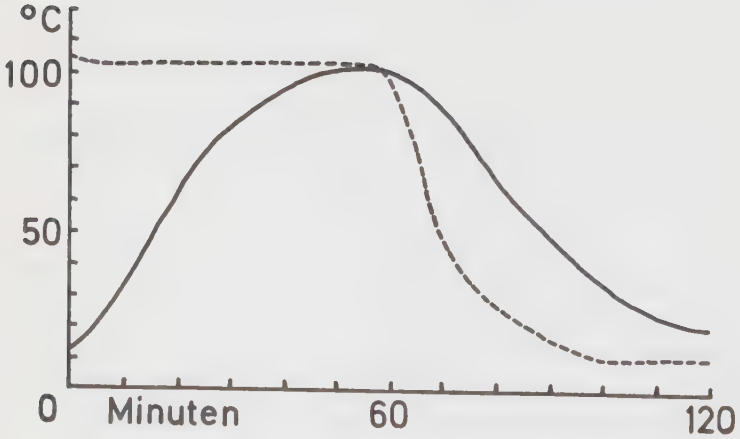


Abb. 2 Temperaturverlauf bei der Herstellung der Modellkonserve 100°

——— Dosenkerntemperatur
- - - - - - - - Wassertemperatur

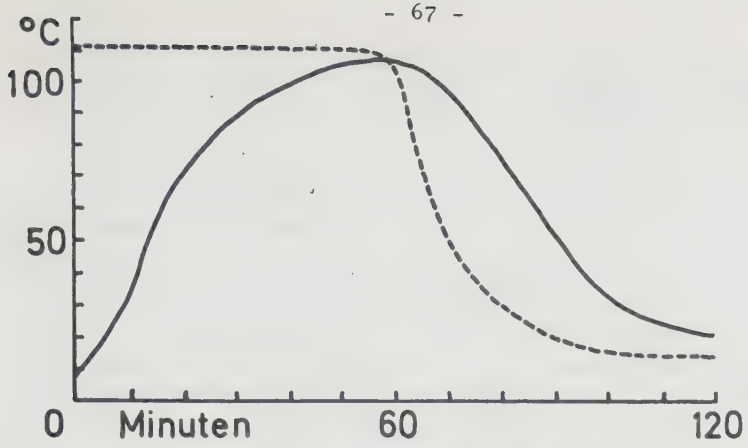


Abb. 3 Temperaturverlauf bei der Herstellung der Modellkonserve 110°

——— Dosenkerntemperatur
- - - - - - - Wassertemperatur

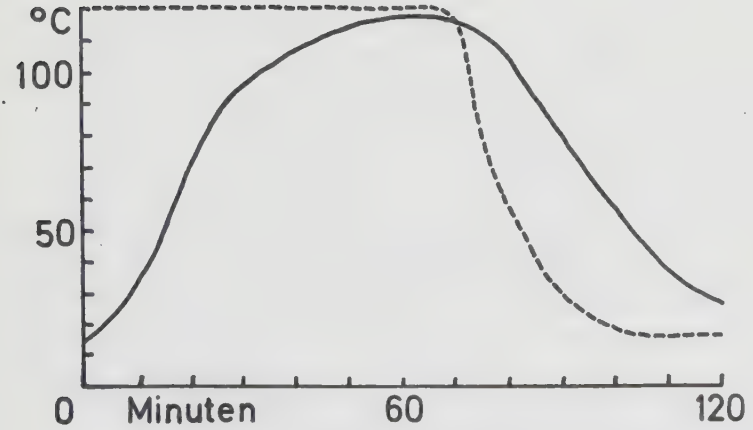


Abb. 4 Temperaturverlauf bei der Herstellung der Modellkonserve 120°

——— Dosenkerntemperatur
- - - - - - - Wassertemperatur

2. Quantitative Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Hämagglutination

Arbeitsmethode

Die i.H. zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein in Fleischwaren wurde nach Angaben von KOTTER u. HERRMANN (1966) durchgeführt.
Die Gewinnung, Tanninisierung und Sensibilisierung der Hammelerythrozyten ist bereits im Abschnitt II. auf S.5 beschrieben worden.
Antiserum, das bei 56°C 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert worden war, wurde nach dem Erkalten mit 10 Vol.-% gewaschenen Hammelerythrozyten versetzt. Die Erythrozyten wurden vorsichtig abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, ohne das schon vorhandene Erythrozytensediment wieder aufzuschütteln.
Nachdem das Antiserum auf diese Weise von Hämolysinen und Isoagglutininen befreit worden war, wurde je 1 ml mit 0,5 ml eines Untersuchungsextraktes (siehe unten) gemischt und für 1 Stunde bei 37°C in den Brutschrank verbracht. Das Gemisch wurde danach 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert, 0,5 ml des geklärten Überstandes in eine Verdünnungsreihe mit physiol. NaCl eingebracht und mit dem CORNWALL-Pipettiergerät von 1:2 über 1:4, 1:8 usw. bis 1:500.000 verdünnt.
13 Verdünnungsreihen wurden in dieser Art gleichzeitig angesetzt. Sie umfaßten die mit den Modellwurstextrakten von 0,1 - 4,0 % Sojaproteinzusatz voradsorbierten Antiserumverdünnungsreihen und eine Verdünnungsreihe von reinem Antiserum in physiol. NaCl (positive Kontrolle, Serumkontrolle) sowie eine Verdünnungsreihe von Antiserum, das mit einem sojaproteinfreien Modellwurstextrakt (Extraktkontrolle voradsorbiert worden war.
Jedem Röhrchen der 13 Verdünnungsreihen wurde 0,1 ml (Ca. 2 Tr.) einer vorbereiteten Aufschwemmung von sensibilisierten Erythrozyten zugesetzt. Der Inhalt wurde auf-

geschüttelt, für 1 Stunde bei 37°C in den Brutschrank verbracht, nochmals aufgeschüttelt und nach ca. 16 Stunden (am nächsten Morgen) die Erythrozytensedimentation beurteilt.

Als Kriterium einer eingetretenen positiven Reaktion bzw. als Beweis für das Vorhandensein freier Antikörper in dem Reaktionsgemisch wurden in erster Linie Erythrozytenagglutinate gewertet, die nach vorsichtigem Aufschütteln des Bodensatzes sichtbar wurden; die teppichförmige Ausbreitung des Sediments am Reagenzglasboden wurde ebenfalls als Beweis für eine eingetretene, positive Reaktion gewertet, jedoch konnte bei nur unvollständiger oder nicht ausgeprägter Teppichbildung nicht ohne weiteres auf einen negativen Ausgang der Reaktion (d.H. Absorption sämtlicher Antikörper durch den Modellwurstextrakt) geschlossen werden, da die Ausbildung eines teppichförmigen Sediments stark von der Form und Regelmäßigkeit des Reagenzglasbodens beeinflußt wurde. Ausschlaggebend für die Bewertung von Ausgang und Stärke der Hämagglutination war daher stets das Vorhandensein und die Größe der Erythrozytenagglutinate.

Zur Extraktgewinnung wurde das Untersuchungsmaterial im Starmix zerkleinert und gründlich durchmischt. 10 g jeder Probe wurden in 20 ml neutraler physiol. NaCl mit dem Ultra-Turrax (Janke u. Kunkel KG.,Staufen i.Br.) homogenisiert und 48 Stunden bei 4°C extrahiert. Die Extrakte wurden 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand für den Test verwendet.
Das Untersuchungsmaterial der Erhitzungsstufen 100°C, 110°C und 120°C wurde vor der Extraktion zusätzlich lyophilisiert.

Untersuchungsmaterial

Je 12 Modellwürste und Modellkonserven eigener Herstellung in den Erhitzungsstufen 75°C, 100°C, 110°C und 120°C wurden in mehreren Ansätzen untersucht.
Für jeden Ansatz (11 Extrakte, 1 Extraktkontrolle, 1 Serumkontrolle) waren 13 ml Antiserum erforderlich.

Aufgrund dieses hohen Verbrauchs mußten mehrere Antiseren eigener Herstellung gemischt werden, um die erforderlichen Mengen einheitlichen Serums zu erhalten.
Darum wurde aus den im ersten Versuch zur Antiserumherstellung gewonnenen Seren 5a/1 bis 8b/3 (siehe Tab. 5-8) ein Mischserum zusammengestellt und mit der Bezeichnung M 1 versehen.
Ein zweites Mischserum, M 2, wurde aus den Seren 5b/3, 7b/3 und 7b/4 zusammengestellt.
Weiterhin wurden die im dritten Versuch zur Antiserumherstellung gewonnenen Antiseren 10/1 bis 10/12 (siehe Tab. 10) zu einem als M3 bezeichneten Mischserum verarbeitet.
Dieses Serum M 3 hatte die Fähigkeit, Sojaprotein in allen geprüften Erhitzungsstufen von 70°C bis 120°C zu präzipitieren; die Überprüfung mittels der Ringpräzipitation ergab folgende Titer:

gegen Promine D 70°C : 1 : 32 000,
gegen Promine D 100°C : 1 : 32 000,
gegen Promine D 110°C : 1 : 32 000 und
gegen Promine D 120°C : 1 : 64 000.

Isoliert verwendet wurden die Antiseren 3 b/1 und 7 a/4.
Die Untersuchung einer Reihe von hocherhitzten Modellkonserven konnte mit Serum 5 b/3 im Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät der Universität München durchgeführt werden; darüber hinaus wurde von dem genannten Institut Anti-Soja-Serum für Vergleichsuntersuchungen zur Verfügung gestellt: Serum Sj. 24 (Titerangabe 1 : 500 000) und Serum Sj. 39 (Titerangabe 1 : 250 000).

Bei eigenen Versuchen zur Titerüberprüfung mittels der i.H. zeigte Serum Sj. 24 gegen Sojaprotein Promine D Titer von 1 : 4000 und 1 : 4 000 000 und gegen Sojaprotein Edi-Pro-N (Ralston Purina Comp.) Titer von 1 : 8000 und 1 : 128 000. Serum Sj. 39 zeigte gegen Sojaprotein Promine D Hämagglutinationstiter von 1 : 256 und 1 : 16 000.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels der i.H. wurden sowohl nach der Sedimentationsform als auch nach dem Vorhandensein von Erythrozytenagglutinaten im aufgeschüttelten Sediment beurteilt. Während die Sedimentation fotografisch festgehalten werden konnte, wurde die Agglutinatbildung je nach Ausfall der Reaktion von - (neg.) bis +++ (stark pos.) beurteilt und die Ergebnisse in Tabellen aufgezeichnet. Für jede Erhitzungsstufe ist daher im folgenden je eine Tabelle und eine zugehörige Abbildung mit der fotografischen Darstellung der entsprechenden Reaktion vorhanden;
für die Erhitzungsstufe 75°C: Tab. 16 und Abb. 5,
für die Erhitzungsstufe 100°C: Tab. 17 und Abb. 6,
für die Erhitzungsstufe 110°C: Tab. 18 und Abb. 7,
für die Erhitzungsstufe 120°C: Tab. 19 und Abb. 8.

Modellbrühwurst 75°C:

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung von 12 Modellbrühwürsten mit steigenden Zusätzen von Sojaprotein. Zur Untersuchung wurde das Serum M 2 verwendet, das einen Hämagglutinationstiter von 1 : 500 000 aufwies (Serumkontrolle). Der negative Extrakt aus einer Modellbrühwurst ohne Sojazusatz (Extraktionskontrolle) absorbierte keine Antikörper aus dem Antiserum, so daß sich hier ebenfalls ein Titer von 1 : 500 000 zeigte. Der Extrakt der 0,1 %igen Wurst schwächte den Hämagglutinationstiter noch nicht ab; erst der Extrakt der 0,2 %igen Wurst führte zu einer Hämagglutinationshemmung um 9 Titerstufen.

Die folgenden Extrakte mit steigendem Sojaproteingehalt führten zu einer kontinuierlichen Abschwächung des Titers um 1 bis 2 Stufen bis zu einem Sojazusatz von 1,5 %, der nur noch in der ersten Verdünnungsstufe eine Verklumpung der Erythrozyten erkennen ließ. Der nächsthöhere Extrakt mit 2 % Sojazusatz hatte schließlich die Antikörper des Serums so weit absorbiert, daß keine eindeutig positive Reaktion mehr festzustellen war.

Die quantitative Abstufung reichte also von einem Zusatz von 0,2 % bis zu einem Zusatz von 1,5 % Sojaprotein im Wurstmaterial. Trotz des hohen Antiserumtiters war eine quantitative Differenzierung der Stufen 2 %, 3 % und 4 % nicht möglich, da sämtliche Antikörper bereits bei 2 % von dem im Untersuchungsextrakt vorhandenen Sojaprotein absorbiert worden waren.
Eine Unterscheidung zwischen dem negativen, sojaproteinfreien Extrakt und demjenigen aus einer Modellbrühwurst mit 0,1 % Sojaprotein war aufgrund des hohen Antiserumtiters nicht möglich; diese geringe Menge antigenen Materials war nicht in der Lage, den hohen Titer in erkennbarem Maße abzuschwächen. In anderen Ansätzen mit schwächeren Antiseren, wie z.B. Serum M 1 , mit einem Hämagglutinationstiter von 1 : 1000 war der Extrakt aus Brühwurst mit 0,1 % Sojaprotein zu einer Hemmung um 4 Titerstufen in der Lage; in diesem Fall reichten allerdings schon Extrakte mit 1,5 % aus, sämtliche Serumantikörper zu binden.

Abb. 5 zeigt eine fotografische Darstellung der in Tabelle 16 aufgezeichneten Reaktion. Während die Auswertung der fotografischen Darstellung auf das Phänomen der Teppichbildung beschränkt bleiben mußte, wurde für die Aufzeichnung in Tabelle 16 in erster Linie das Vorhandensein und die Stärke der Erythrozytenagglutinate im Sediment nach vorsichtigem Aufschütteln desselben zur Beurteilung der eingetretenen Hämagglutinationshemmung herangezogen.

Tabelle 16

Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.
Modellbrühwurst (75°C); Serum M 2

	1 : 2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648
NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
0.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
0.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.4	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	+++	+++	+++	+++	+++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.75	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0	+++	+++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	+++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.0	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 5

Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.

Modellbrühwurst (75°C); Serum M 2

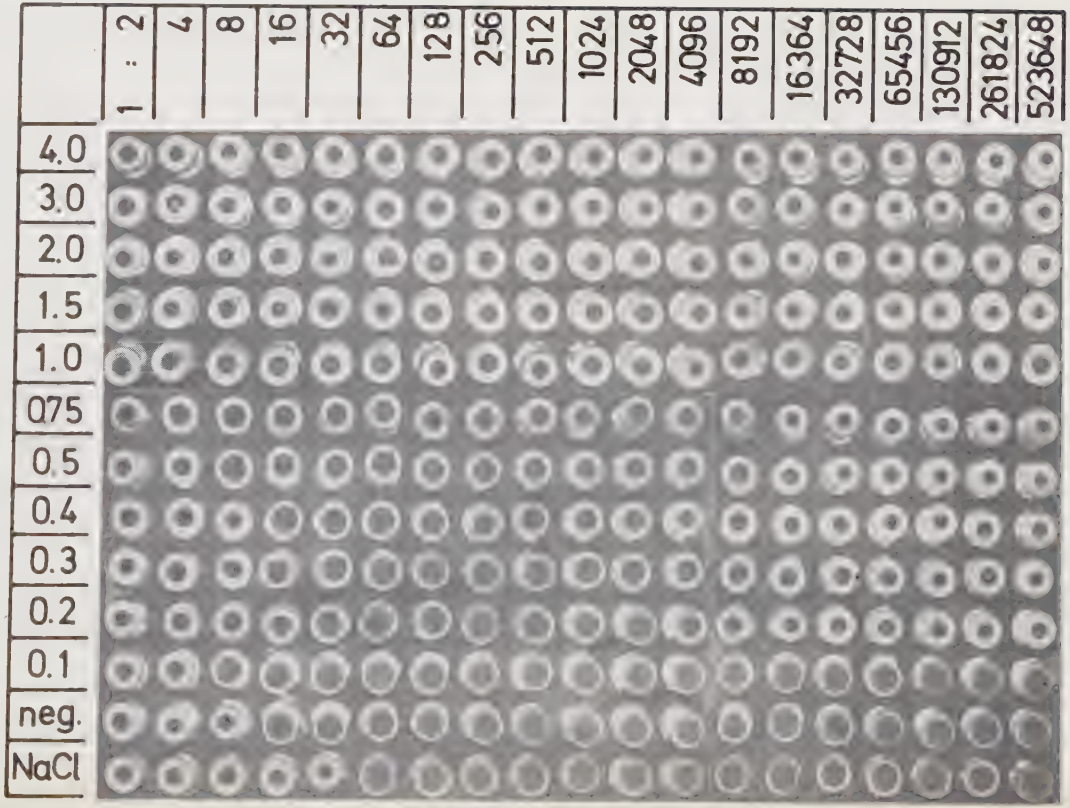


Tabelle 17

Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.

Modellkonserven 100°C; Serum M 2

	1 : 2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648
NaCl	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+±	±+	±+	-
neg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	±+	±+	-	-	-
0.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	±+	-	-
0.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	±+	-	±+	-
0.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	±+	±+	-	-	±+
0.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	±+	-	-	-
0.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±+	±+	±+
0.75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	±+	±+	-	-	-
1.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	±+	-	-	-
1.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	±+	-
2.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±+	±+	±+	±+
3.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	±+	±+	±+
4.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	±+	±+	±+	-	-

Abb. 6

Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.
Modellkonserve 100°C; Serum M 2

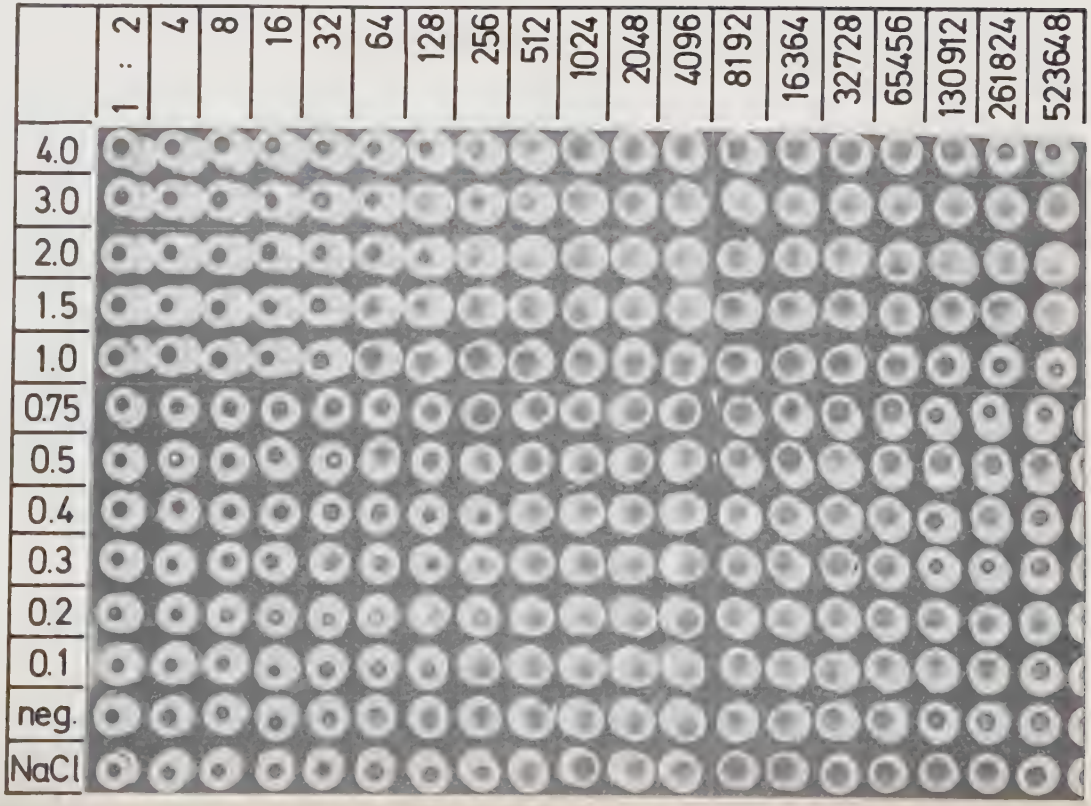


Tabelle 18

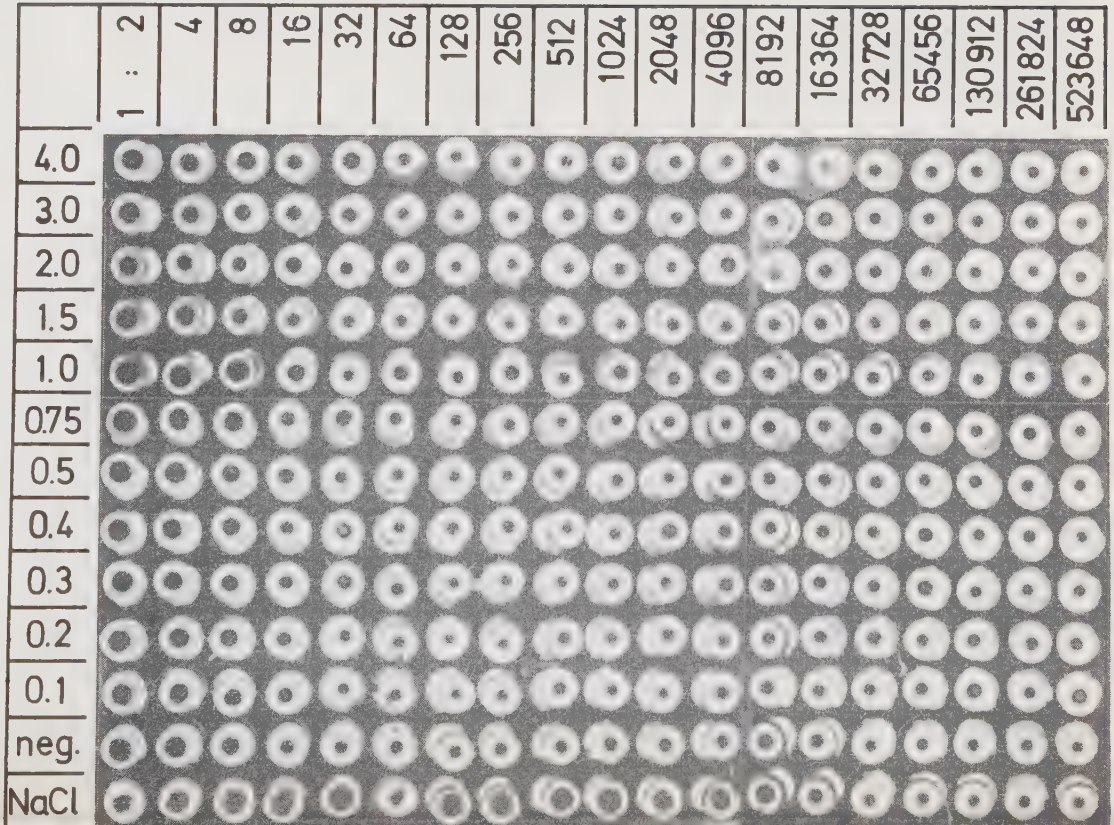
Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.

Modellkonserve 110°C; Serum M 3

	1 : 2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648
NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
neg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.4	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.75	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	++	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.0	+	+	+	++	++	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.0	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.0	-	-	-	-	-	±	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 7

Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.
Modellkonserve 110°C; Serum M 3

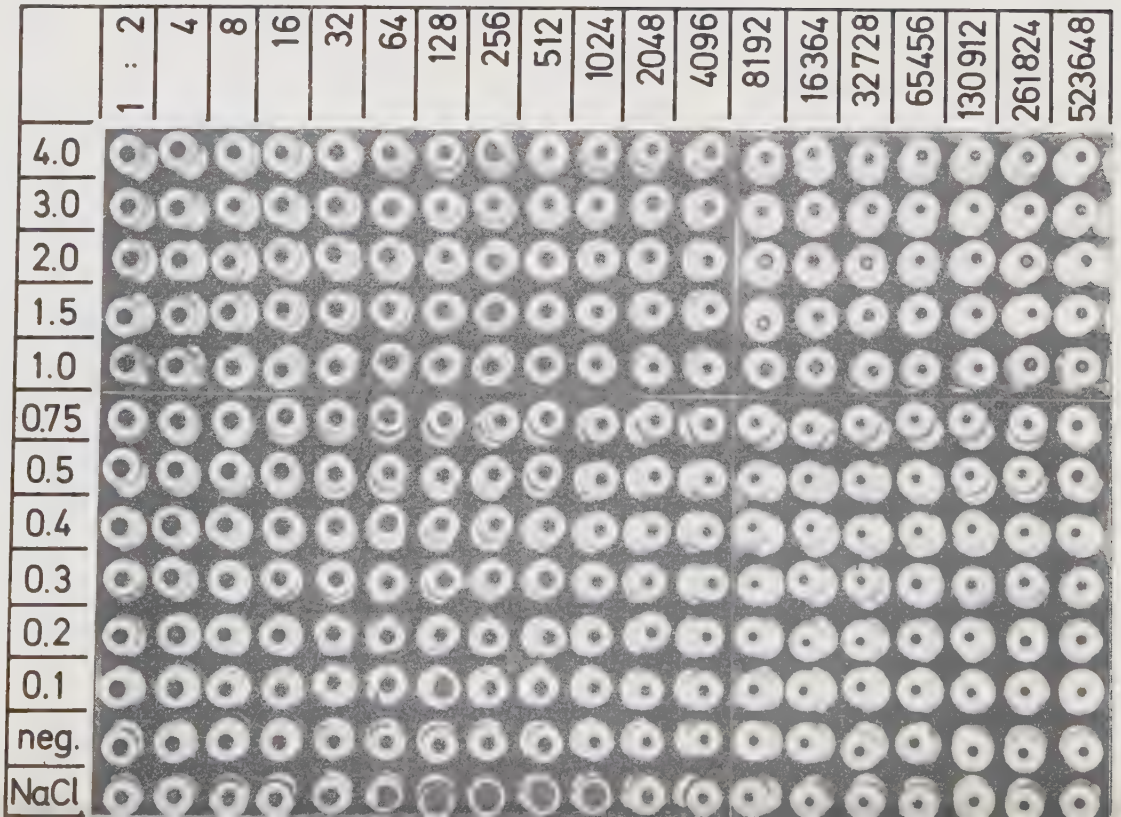


Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.
Modellkonserve 120°C; Serum Sj. 39 (München)

	1 : 2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824	523648
NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	±	-	±	-	-	-	-
neg.	+++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 8

Quantitative Untersuchung mit Hilfe der i.H.
Modellkonserve 120°C, Serum Sj. 39 (München)



Ein Vergleich zwischen den beiden Darstellungen zeigt, daß die fotografische Aufnahme für sich nur eine quantitative Abstufung bis 0,5 % gestatten würde; eine Teppichbildung ist ab 0,75 % nicht mehr vorhanden, obwohl nach Tabelle 16 bis zur Verdünnungsstufe 1 : 16 deutliche Agglutinate im aufgeschüttelten Sediment zu erkennen waren.
Wurden beide Beurteilungskriterien zur Auswertung herangezogen, konnte zwischen Sojaproteinzusätzen in Modellbrühwürsten von 0 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,75 %, 1,0 % 1,5 % und 2,0 % unterschieden werden.

Modellkonserven 100°C:

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Untersuchung einer Reihe Extrakte aus Modellkonserven 100°C dargestellt; das verwendete Antiserum - wiederum M 2 - hatte in diesem Fall nur einen Hämagglutinationstiter von 1 : 32 000 (Serumkontrolle). Das Antiserum zeigte nach Absorption mit dem Kontrollextrakt aus der fremdeiweißfreien Modellkonserve eine Titerabschwächung um eine Stufe (neg. Extraktkontrolle).
Die sojaproteinhaltigen Extrakte waren in keiner der untersuchten Konzentrationen in der Lage, den Serumtiter weiter abzuschwächen; selbst nach Absorption mit dem Extrakt aus der Modellkonserve mit 4 % Sojaprotein wies das Antiserum noch einen Titer von 1 : 16 000 auf. In keinem der durchgeführten Ansätze war eine quantitative oder qualitative Aussage über den Sojaproteingehalt der untersuchten Modellkonserven 100°C mit Hilfe der i.H. möglich.
Abb. 6 zeigt in fotografischer Darstellung die gleiche Reaktion wie Tabelle 17.

Modellkonserven 100°C und 120°C:

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Extrakten aus Modellkonserven mit Sojaprotein, die auf 110°C und 120°C erhitzt worden waren, ließen weder eine quantitative Abstufung noch eine eindeutige qualitative Aussage zu. Lediglich in einem Ansatz zur Untersuchung von Modellkonserven 110°C mit Anti-Sojaprotein-Serum Sj 39 aus München deutete sich eine Titer-

abschwächung des Serums durch die fremdeiweißhaltigen Extrakte an. Leider zeigte das Serum Sj 39 in dem fraglichen Ansatz nur einen Hämagglutinationstiter von 1 : 256 und wurde dementsprechend schon von einem Extrakt aus einer Konserve mit 0,4 % Sojaprotein vollständig gehemmt. Die Reaktion war nur an vorhandenen Erythrozytenagglutinaten nach Aufschütteln des Sediments abzulesen; eine Teppichbildung war nicht vorhanden. Dieses Ergebnis ließ sich nicht reproduzieren.

Die Ergebnisse der Untersuchung einer Reihe von Modellkonserven 110°C eigener Herstellung mit Sojaproteinzusätzen von 0,2 % bis 4 % und eigenem Serum 7 b/3 im Institut für Nahrungsmittelkunde der Universität München ließen ebenfalls keine quantitative Abstufung des Fremdeiweißgehaltes zu. Das Antiserum 7 b/3 zeigte dabei einen Titer von 1 : 500 000. Der negative Kontrollextrakt schwächte den Antiserumtiter bis 1 : 256 ab; dagegen wies das mit dem Extrakt mit 3 % Sojazusatz adsorbierte Serum noch einen Titer von 1 : 4000 auf. Diese regellose Abschwächung des Hämagglutinationstiters ließ die Möglichkeit eines qualitativen Nachweises von Sojaprotein in autoklaviertem Material mit Hilfe der i.H. fraglich erscheinen.

In den Tabellen 18 und 19 sind die Ergebnisse der Untersuchungen je einer Reihe Modellkonserven 110°C bzw. 120°C aufgezeichnet. Aus ihnen läßt sich eine Information über den Fremdeiweißgehalt des untersuchten Materials nicht entnehmen. Abb. 7 und 8 zeigen die entsprechenden fotografischen Darstellungen der in Tabelle 18 und 19 aufgezeichneten Reaktionen.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Die bei der vorstehend beschriebenen Versuchsanordnung gewonnenen Resultate lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Mit Hilfe der i.H. war nur in der niedrigsten Erhitzungsstufe (75°C) eine quantitative Bestimmung von Sojaproteinzusätzen möglich.

- Ein qualitativer Nachweis war erst von 0,2 % an zu führen.
- In den höheren Erhitzungsstufen (100°, 110° und 120°C) war selbst ein qualitativer Nachweis von Sojaprotein mit der i.H. nicht zu führen.

3. Quantitative Untersuchungen mit Hilfe der Präzipitatmessung

Die Untersuchungen mit Hilfe der Präzipitatmessung erfolgten nach Angaben von DEGENKOLB und HINGERLE (1967).

Arbeitsmethode:

Von Modellbrühwürsten und -konserven der Erhitzungsstufen 75°C und 100°C wurden je 15 g aus dem im Starmix zerkleinerten Wurstgut entnommen und mit 30 ml physiol. NaCl in ein Zentrifugenglas von 100 ml Inhalt gefüllt. Während des Homogenisierens mit dem Ultra-Turrax wurde das Gemisch durch Zugabe von 1 n NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 - 8,0 eingestellt und anschließend nochmals genau 30 sec. bei 25000 U/min homogenisiert. Das Extraktionsgemisch wurde dann 10 Min. lang bei 3000 g zentrifugiert, um es von ungelösten Schwebestoffen zu befreien. Die beim Zentrifugieren gebildete Fettdecke wurde mit einer Kanüle durchstoßen und der darunterliegende Extrakt zur Weiterverwendung mit einer Spritze abgesaugt.

Zur Untersuchung der Modellkonserven 100°, 110° und 120°C wurden je 15 g des Wurstgutes lyophilisiert. Das getrocknete Material wurde mit je 40 ml physiol. NaCl aufgenommen und die Extraktion wie oben durchgeführt.
Ein Milliliter Antiserum wurde mit 0,5 ml Untersuchungsextrakt eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert (5 Min. bei 1000 g) und entweder direkt als Sediment im graduierten Röhrchen (Ø 2 mm) quantitativ ausgewertet, oder in eine Kapillare (Schmelzpunktbestimmungsröhrchen Ø 1 - 1,2 mm) aufgesaugt; die Kapillare wurde auf einer Seite mit dunklem Plastilin verschlossen und nochmals 5 Min. bei 1000 g zentrifugiert. Das Präzipitat war dann als helle Säule über dem dunklen Plastilin meßbar.

Untersuchungsmaterial

Je 12 Modellwürste und -konserven (Brühwurstbrät) mit Sojaproteinzusätzen von 0,1 % bis 4 %, sowie eine Konserve ohne Fremdeiweiß wurden in jeder der vier Erhitzungsstufen 75°C, 100°C, 110°C und 120°C nebeneinander in mehreren Ansätzen untersucht.
Für die Untersuchungen der Modellwürste 75°C wurde das Serum 7 a/4 und das Serum M 2 verwendet.
Für die Untersuchungen der Modellkonserver 100°C, 110°C und 120°C wurden dagegen Antiseren verwendet, die gegen hocherhitztes Eiweiß hergestellt worden waren, wie Serum 3 b/1 bzw. Antiserum, das einen hohen Titer gegen hocherhitztes Sojaprotein in der Ringpräzipitation gezeigt hatte, wie das Serumgemisch HAP, das mit 120°C erhitztem Promine D noch in einer Verdünnung von 1 : 64 000 reagierte.
Zur Überprüfung der Spezifität der Präzipitationsreaktionen wurden außerdem noch Rohwurst ohne Fremdeiweiß, eine Brühwurst mit aME und HE, eine Dosenbrühwurst mit aME und HE und eine Schinkenwurst (100°C) mit aME und HE aus der Versuchsproduktion einer Berliner Fleischwarenfabrik mit den Seren 7 a/4 und 3 b/1 untersucht.

Ergebnisse

Modellbrühwurst 75°C:

Die Untersuchung der Extrakte aus Modellbrühwürsten ohne Zusatz und mit Sojaprotein von 0,1 - 4,0 % ergab in allen durchgeführten Ansätzen mit dem Antiserum 7 a/4 und dem Serum M 2 eine konzentrationsabhängige Ausbildung von Präzipitaten. Die ungenaue Kalibrierung der zur Darstellung der Präzipitate verwendeten Schmelzpunktbestimmungsröhrchen (Ø 1,2 - 1,4 mm) führte zu Unregelmäßigkeiten; die Ergebnisse ließen sich trotz Verwendung des gleichen Antiserums nicht eindeutig reproduzieren. Abbildung 10 zeigt die Präzipitatmessung einer Untersuchung von Modellbrühwürsten mit dem Serum M 2. In dieser Abbildung ist deutlich zu erken-

nen, daß schon ein Sojaproteinzusatz von 0,1 % klar von der negativen Modellbrühwurst zu unterscheiden ist. Darüber hinaus ermöglicht ein Vergleich der Höhe der Präzipitatsäulen eine sichere Differenzierung zwischen allen geprüften Konzentrationen bis zu einem Zusatz von 2 %. Höhere Zusätze als 2 % ergaben wieder geringere Präzipitate.

In anderen Untersuchungen, bei denen das Antiserum 7 a/4 verwendet wurde, war eine kontinuierliche Zunahme auch über 2 % bis 4 % festzustellen.

Die niedrigen Sojaproteinzusätze von 0,1 - 0,5 % waren in alle Untersuchungen der Erhitzungsstufe 75°C quantitativ zu differenzieren. Anhand der Messung der Präzipitatmenge waren dabei Zusatzunterschiede von 1 °/oo Sojaprotein in den Modellbrühwürsten nachzuweisen.

Wurden Modellbrühwurstextrakte mit Anti-Sojaprotein-Serum in eigens für diesen Zweck entwickelten, graduierten Meßröhrchen gemischt und inkubiert, so konnte nach beendeter Reaktion das entstandene Präzipitat direkt abzentrifugiert und gemessen werden, ohne - wie bei Verwendung der Kapillarröhrchen - eine Umfüllung des Präzipitates und eine zweimalige Zentrifugierung erforderlich zu machen. Bei dieser direkten Auswertung des Präzipitates im graduierten Präzipitatmeßröhrchen war eine eindeutige Erkennung von Sojaproteinzusätzen erst ab 0,2 % möglich (Abb. 9).

Unterschiede bestanden trotz Einhaltung eines einheitlichen Extraktionsmodus und der Benutzung des gleichen Antiserums zwischen den Maximalwerten der Präzipitate, die teils bei 2 %, teils bei 3 % oder, wie bei Serum 7 a/4, bei 4 % Sojaproteinzusatz lagen.

Bedingt durch den größeren Durchmesser der graduierten Meßröhrchen gestaltet sich eine Unterscheidung der Präzipitatmengen in den niedrigen Zusatzstufen von 0,1 - 0,4 % schwieriger als in den nur halb so dicken Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, doch ist auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit ausgeprägt.

Modellkonserven 100°C, 110°C und 120°C:

Die Untersuchung der Modellkonserven mit Hilfe der Präzipitatmessung ergab demgegenüber eine etwas geringere Empfindlichkeit der Methode. Bei der Untersuchung von Modellkonserven der Erhitzungsstufe 100°C mit Antiserum M 3 ließen sich die Sojaproteinzusätze erst ab 0,4 % deutlich von der negativen Modellkonserve unterscheiden. Abbildung 12 zeigt eine Präzipitatmessung in Schmelzpunktbestimmungsröhrchen; in Abbildung 11 ist eine vergleichbare Untersuchung in graduierten Meßröhrchen dargestellt. Auch dort ist erst ein Zusatz von 0,3 % an der Präzipitatbildung zu erkennen.
Insgesamt sind die gemessenen Präzipitatmengen in der Erhitzungsstufe 100°C wesentlich geringer als in der niedrigsten Erhitzungsstufe 75°C. Dadurch wird vor allem bei der Benutzung der graduierten Meßröhrchen mit einem Durchmesser von 2 mm eine Unterscheidung zwischen den Präzipitaten und damit den Zusatzmengen erschwert. Jedoch ist auch bei der Untersuchung der Modellkonserven 100°C (Abb. 11) und besonders bei Verwendung der engeren Schmelzpunktbestimmungsröhrchen (Abb. 12) eine konzentrationsabhängige Ausbildung der Präzipitate unverkennbar. Die größte Präzipitatmenge ist in Abbildung 11 bei 2 % und in Abbildung 12 bei 3 % Sojaproteinzusatz zu finden. Höhere Zusatzmengen sind durch einen fortschreitenden Rückgang der Präzipitatmenge gekennzeichnet.

Bei Untersuchung von Modellkonserven 110°C mit Antiserum M 3 war der qualitative Nachweis von Sojaproteinzusätzen mit der Präzipitatmessung in graduierten Meßröhrchen erst ab 0,75 % zu führen. In Abbildung 13 ist das Ergebnis der Untersuchung einer Reihe von Modellkonserven dieser Erhitzungsstufe mit Antiserum M 3 dargestellt. Von der negativen Kontrollkonserve bis zu der Konserve mit 0,4 % Sojaprotein ist kein deutlich meßbares Präzipitat ausgebildet. Erst von 0,5 % an bis hinauf zu 4 % nimmt die Präzipitatmenge kontinuierlich zu. Eine quantitative Differenzierung zwischen den Konzentrationen 0,75 %, 1 %, 2 % und 4 % ist dabei anhand der Präzipitatmengen möglich. Wurden zur Untersuchung von Modellkonserven 110°C statt der graduierten Meßröhrchen

Schmelzpunktbestimmungsröhrchen verwendet, konnten schon Zusatzmengen von 0,2 % erkannt werden. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis einer derartigen Untersuchung. Die ungenaue Kalibrierung führte auch hier zu Sprüngen in der Präzipitatkurve, die die quantitative Aussage beeinträchtigen, wie z.B. zwischen 0,3 % und 0,4 % und zwischen 1 % und 1,5 % Sojaproteinzusatz. Das größte Präzipitat ist hier bei 2 % ausgebildet, während Abbildung 13 einen kontinuierlichen Anstieg bis 4 % erkennen läßt.

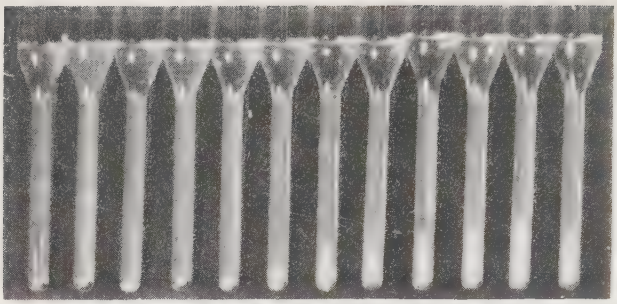
Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen die Untersuchungsergebnisse von Modellkonserven der Erhitzungsstufe 120°C mit Antiserum M 3. Bei Verwendung der graduierten, größer kalibrigen Meßröhrchen war der Nachweis von Sojaproteinzusätzen mit der Präzipitatmessung erst ab 0,75 % möglich.

Eine quantitative Differenzierung der Zusätze zwischen 0,75 % und 2 % war aufgrund der geringen Präzipitatmengen nicht möglich; erst die Konzentrationen 3 % und 4 % ergaben gut meßbare Präzipitatmengen. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch, wenn zur Messung der geringen Präzipitate die engeren Schmelzpunktbestimmungsröhrchen benutzt werden; hierbei waren, wie sich aus Abbildung 16 entnehmen läßt, schon Zusätze von 0,2 % Sojaprotein in Modellkonserven 120°C mit dem Antiserum M 3 von der negativen Kontrollreserve zu unterscheiden. Abgesehen von einem Sprung bei 1 % ist in Abbildung 16 ein nahezu kontinuierlicher, konzentrationsabhängiger Anstieg der Präzipitatkurve bis zur höchsten geprüften Zusatzmenge von 4 % zu beobachten.

Die in Abbildung 17 dargestellte Vergleichsuntersuchung von Modellbrühwurst und Modellkonserven in Fleischwaren, die aME und HE enthalten, stellt die Spezifität der Präzipitatmessung unter Beweis.

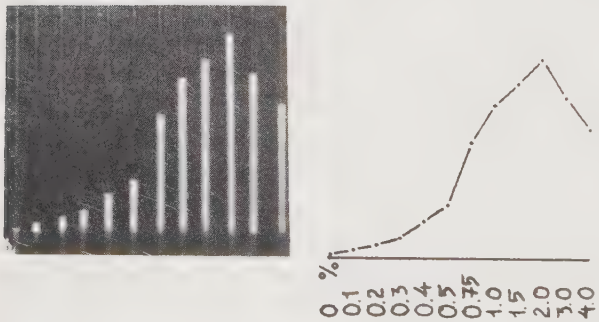
Zusammenfassung der Ergebnisse:

Zur quantitativen Untersuchung von Modellbrühwürsten und -konserven mittels der Präzipitatmessung ist zusammenfassend festzustellen:



Modellbrühwurst 75°C
Serum M 2

Abb. 9
Präzipitatmessung in graduierten Messröhrchen Ø 2 mm



Modellbrühwurst 75°C
Serum M 2

Abb. 10
Präzipitatmessung in Schmelzpunktbestimmungsröhrchen
Ø 1.2 - 1.4 mm

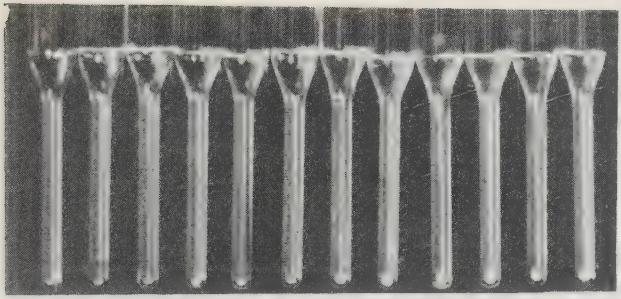


Abb. 11
Präzipitatmessung in graduierten Messröhrchen Ø 2 mm

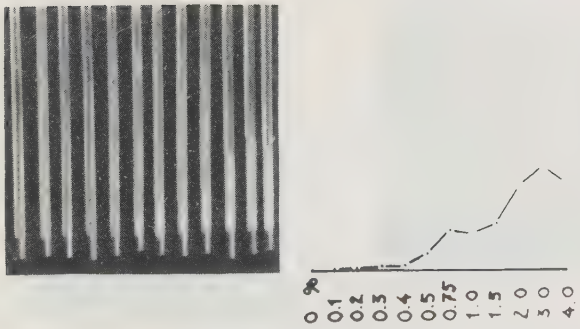
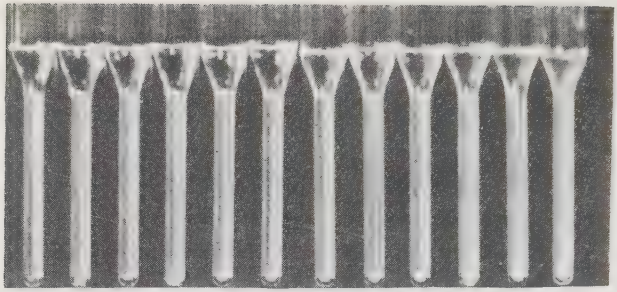


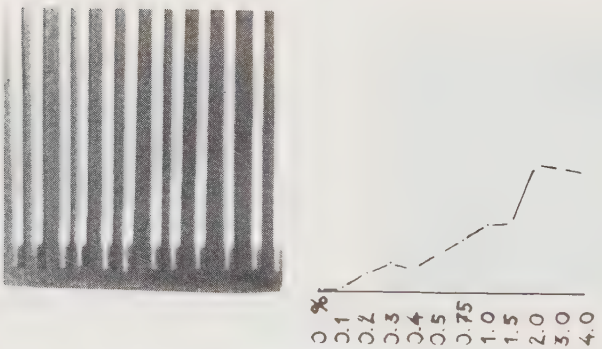
Abb. 12
Präzipitatmessung in Schmelzpunktbestimmungsröhrchen Ø 1.2 - 1.4 mm



Modellkonserve 110 °C Serum M 3

Abb. 13

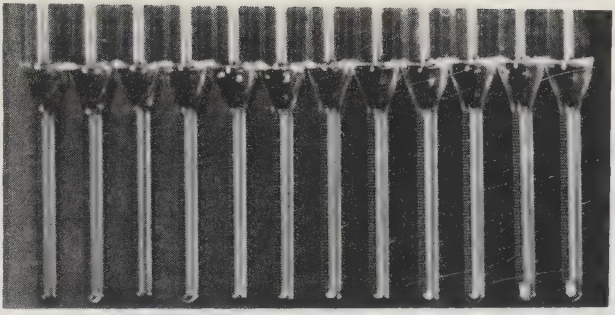
Präzipitatmessung in graduierten Messröhrchen Ø 2 mm



Modellkonserve 110 °C Serum M 3

Abb. 14

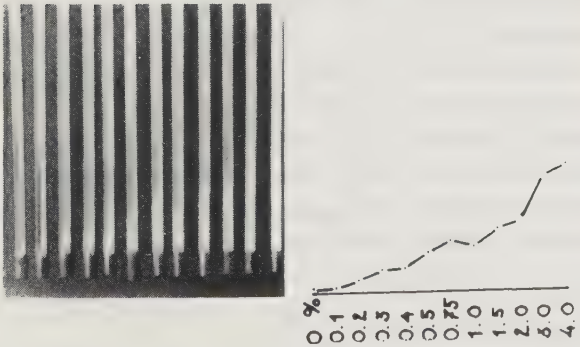
Präzipitatmessung in Schmelzpunktbestimmungsröhrchen Ø 1.2 - 1.4 mm



Modellkonserve 120 °C Serum M 3

Abb. 15

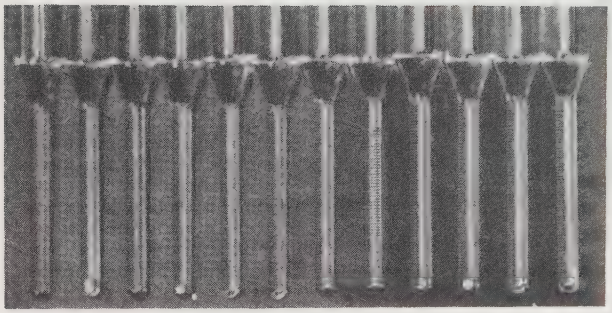
Präzipitatmessung in graduierten Messröhrchen Ø 2 mm



Modellkonserve 120 °C Serum M 3

Abb. 16

Präzipitatmessung in Schmelzpunktbestimmungsröhrchen Ø 1.2 - 1.4 mm



K_1 K_2 K_3 K_4 A B C D K_5 K_6 E F

K_1 : Modellbrühwurst 75°C mit o.5 % Sojaprotein
K_2 Modellbrühwurst 75°C mit 3.o % Sojaprotein
K_3 Modellkonserve 100°C mit o.5 % Sojaprotein
K_4 Modellkonserve 100°C mit 3.o % Sojaprotein
A Rohwurst ohne Zusatz von Fremdeiweiß
B Brühwurst 75° mit 1.o % aMe und 4.o % HE
C Schinkenwurst 100°C mit 1.o % aMe u. 4.o % HE
D Dosenbrühwurst 100°C mit 1.o % aMe
K_5 Modellkonserve 100°C mit o.5 % Sojaprotein
K_6 Modellkonserve 100°C mit 3.o % Sojaprotein
E Schinkenwurst 100°C mit 1.o % aMe u. 4.o % HE
F Dosenbrühwurst 100°C mit 1.o % aMe

Serum 7a/4

Serum 3b/1

Abb. 17
Spezifitätskontrolle

- In niedrig erhitztem Material (75°C) ließ sich Sojaprotein schon ab o,1 % nachweisen; eine quantitative Differenzierung der Zusatzmengen war in allen geprüften Konzentrationen möglich.

- In den Modellkonserven 100°C waren Sojaproteinzusätze erst ab 0,4 % zu erfassen; diese Eigentümlichkeit hat ihre Ursache in der Qualität des verwendeten Antiserums N 3, das mit der Erhitzungsstufe 100°C geringere Präzipitatmengen bildete als mit den höheren Erhitzungsstufen 110° und 120°C.
  Die über 0,4 % liegenden Zusätze von Sojaprotein konnten auch hier quantitativ differenziert werden.

- In den Modellkonserven 110° und 120°C war Sojaprotein ab 0,2 % nachzuweisen.
  Die Präzipitatmessung gestattete, wenn sie in engen Schmelzpunktbestimmungsröhrchen durchgeführt wurde, in diesen Erhitzungsstufen noch die Differenzierung aller geprüften Zusatzmengen.

4. Quantitative Untersuchungen mit Hilfe der Immunelektrophorese

Arbeitsmethode

Die Durchführung der I.E. erfolgte nach Angaben von SINELL und KLUGE-WILM (1962) mit einer Apparatur 6800 A der Firma LKB. 18 Objektträger wurden für eine Untersuchungsreihe in Kunststoffrahmen eingelegt und auf einem waagerechten Tischchen mit 1%igem gepufferten Agar (Agarose, Firma Serva) beschichtet. Mit einer zur Apparatur gehörigen Spezialstanzform wurden pro Objektträger zwei runde Antigenbassins mit einem Durchmesser von 1 mm und eine dazwischenliegende, 1 mm breite und 6,5 cm lange Rinne in den erstarrten Agar gestanzt. Die Bassins wurden sofort ausgehoben; der in der vorgestanzten Antiserumrinne befindliche Agar wurde jedoch zur Gewährleistung eines gleichmäßigen Stromflusses weiterhin auf dem Objektträger belassen.

5 µl eines Untersuchungsextraktes wurde in die zwei Bassins eines Objektträgers gleichmäßig eingefüllt und 30 Min. im elektrischen Feld (250 V konstant; I_o 28 mA, I_t 32 mA) aufgetrennt. Anschließend wurde die vorgestanzte Rinne mit einem Spezial-Gelmesser (LKB) ausgehoben und mit 0,1 ml Antiserum gefüllt.
Die Objektträger wurden dann für 20 Std. bei Zimmertemperatur in eine feuchte Kammer verbracht, wo das Antiserum aus der Rinne gegen den aufgetrennten Untersuchungsextrakt diffundierte. Im Agar bildeten sich dabei schmale opalisierende Präzipitatlinien oder -bögen. Nach Beendigung der Diffusion wurde das überschüssige, nicht präzipitierte Material aus dem Agar durch 24-stündiges Einlegen in mehrfach gewechselte physiol. NaCl entfernt. Nach einer abschließenden 30-minütigen Spülung in Aqua dest. wurden die Präparate mit Filterpapierstreifen abgedeckt und mit einem Gebläse vorsichtig getrocknet. Nach einem nochmaligen Befeuchten des Filterpapiers konnte dieses ohne Schwierigkeit von der eingetrockneten Agarschicht abgehoben werden. Zur besseren Sichtbarkeit der Präzipitate wurden die Präparate mit Amidoschwarz angefärbt.

Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung der auf 75°C, 100°C, 110°C und 120°C erhitzten Modellbrühwürste und -konserven wurden die Antiseren M 1 (aus den im ersten Versuch zur Antiserumherstellung gewonnenen Seren 5 a/1 bis 8 b/3, Tab. 5 - 8) und M 3 (aus den im dritten Versuch zur Antiserumherstellung gewonnenen Seren 10/1 bis 10/12, Tab. 10) verwendet.
10 g Untersuchungsmaterial jeder Modellwurst wurden mit 20 ml physiol. NaCl im 100 ml-Zentrifugenglas mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und 24 Std. bei Zimmertemperatur extrahiert. Das den auf 100°C, 110°C und 120°C erhitzten Modellkonserven entnommene Material wurde vor der Extraktion lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde (bezogen auf das Feuchtgewicht) mit physiol. NaCl im Verhältnis 1 :2 gemischt und wie oben extrahiert. Nach beendeter Extraktion wurde 10 Min. bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand

durch ein Papierfilter gegeben. Das Filtrat wurde als Antigenmaterial für die Untersuchung verwendet.

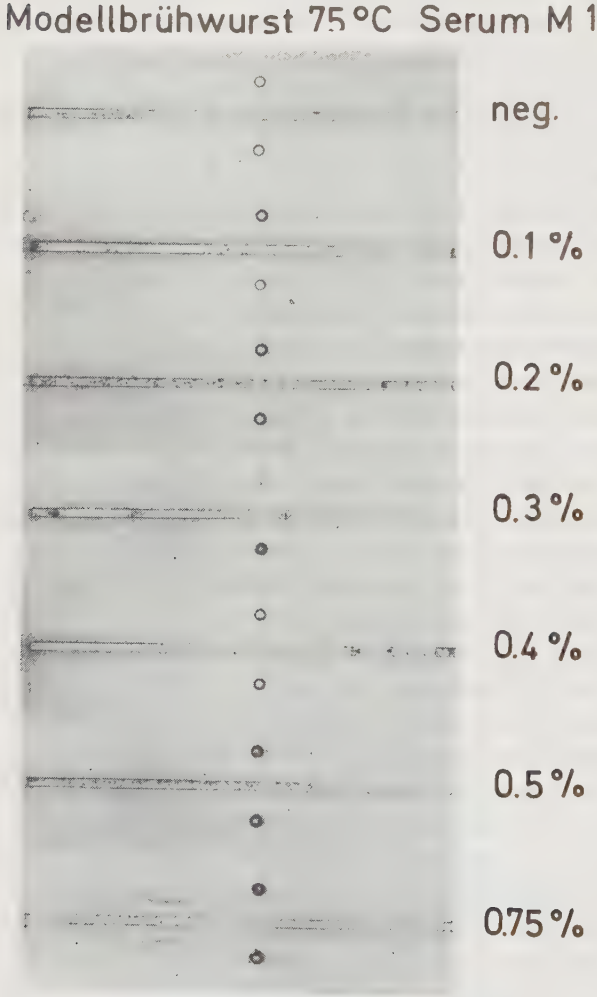
Ergebnisse

Die Extrakte der Modellbrühwürste mit Sojaproteinzusätzen von 0,1 % bis 4,0 % ließen gegen das Antiserum M 1 bereits ab 0,2 % Präzipitate erkennen. Gegen das Antiserum M 3 kam es erst ab 0,75 % Sojaproteinzusatz zur Ausbildung eines erkennbaren Präzipitats. Für die Untersuchungen der Modellbrühwürste wurde daher das Antiserum M 1 bevorzugt.

Abb. 18 und 19 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung einer Reihe von Modellbrühwürsten mit Sojaproteinzusätzen von 0,1 - 4,0 % und einer Modellbrühwurst ohne Fremdeiweiß (neg.) mit dem Antiserum M 1. Die negative Kontrollwurst zeigt - wie in allen durchgeführten Ansätzen - kein Präzipitat. Auch ein Zusatz von 0,1 % Sojaprotein ist noch nicht zu erkennen. Erst der Extrakt aus der Modellbrühwurst mit 0,2 % Sojaprotein kann an einem geringen Präzipitat im anodischen Bereich erkannt werden. Dieses Präzipitat ist noch nicht scharf umrissen ausgebildet; es verdichtet sich in den höheren Konzentrationen bis 0,5 % zu einer leicht geschwungenen, anodenwärts stärker gekrümmten, feinen Linie, die an ihren Enden verschwommen erscheint.
Von 0,75 % Sojaproteinzusatz an ist die Ausbildung eines zweiten Präzipitates zu bemerken, das von einer Antigenfraktion gleicher Bewegungsrichtung und -geschwindigkeit im elektrischen Feld herrühren muß. Dieses Präzipitat verdichtet sich bis 1,5 % zu einer leicht geschwungenen Linie, deren anodisches Ende sich dem des ersten Präzipitates annähert, während die kathodischen, den Bassins zugewandten Enden auseinanderstreben. Das zweite Präzipitat ist bei 1,5 % bereits ebenso stark ausgebildet wie das erste Präzipitat, ist jedoch kürzer als dieses.
Bei Konzentrationen über 1 % Sojaproteinzusatz beginnt das erste, näher an der Antiserumrinne befindliche Präzipitat, seine schmale, scharf umrissene Form zu verlieren und nimmt

Abb. 18

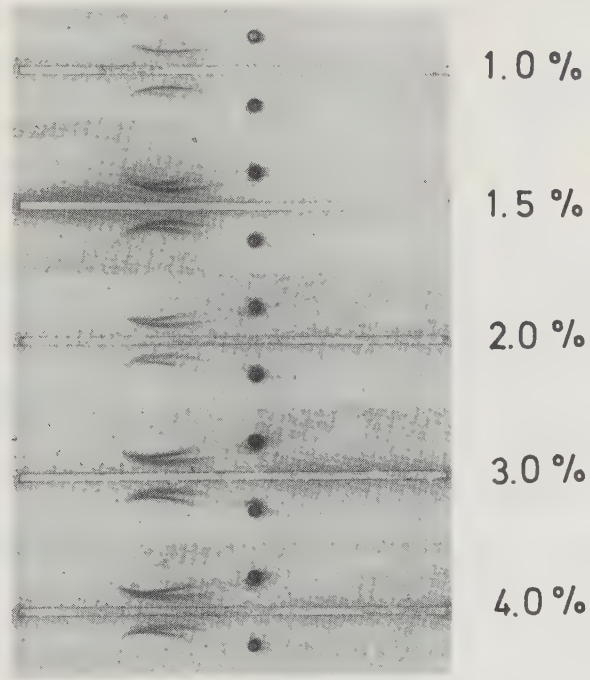
Quantitative Untersuchung mit der Immunelektrophorese



Anode links

Abb. 19

Quantitative Untersuchung mit der Immunelektrophorese



Anode links

in den steigenden Konzentrationen eine weniger scharf konturierte, breitere Form an. Seine Stärke läßt von 2 % aufwärts fortschreitend nach. Das zweite Präzipitat nimmt dagegen kontinuierlich zu und übertrifft in den Konzentrationen von 2 % bis 4 % das erste Präzipitat an Dichte und Deutlichkeit.
In den höheren Konzentrationen von 3 % und 4 % ist darüber hinaus das Auftreten von kleinen Diffusionsbanden an den Bassins festzustellen, die sich mit den kathodenwärts gerichteten Ausläufern der beiden Präzipitate vereinigen.

An Hand dieser Merkmale ließ sich eine eindeutige Differenzierung der Sojaproteinzusätze in den untersuchten Modellbrühwürsten durchführen.
Als Grenze für den qualitativen Nachweis des zugesetzten Sojaproteins muß nach Abbildung 18 der Zusatz von 0,2 % angesehen werden. In anderen Ansätzen war auch schon ein Zusatz von 0,1 % zu erkennen, wenngleich sich diese geringgradige Anfärbung des Präzipitates nicht mehr fotografisch erfassen ließ.

Modellkonserven 100°C, 110°C und 120°C

Die Modellkonserven der Erhitzungsstufen 100°C, 110°C und 120°C wurden mit dem Mischserum M 3 untersucht, nachdem Präzipitationsversuche ergeben hatten, daß das Antiserum M 1 ausschließlich mit niedrigerhitztem Material reagierte.

Bei der immunelektrophoretischen Untersuchung der bei 100°C und 110°C erhitzten Modellkonserven wurden im wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse festgestellt. Die aus dem lyophilisierten Material hergestellten Extrakte waren teilweise gelatineartig erstarrt und mußten durch schonende Erwärmung wieder verflüssigt werden, um sie in die Antigenbassins einfüllen zu können. Die starke Anfärbung der Antigenbassins und ihrer unmittelbaren Umgebung machte deutlich, daß eine Bewegung der hocherhitzten Eiweiße im elektrischen Feld nur in ganz geringem Maße erfolgt war, und die Antigen-Antikörper-Reaktion sich auf die Bassins und

ihre engste Umgebung beschränkte. Nur in einigen Fällen waren Sojaproteinzusätze von 3 % und 4 % zu Modellkonserven 100°C und 110°C an der Ausbildung eines schwachen, diffusen, ungebogenen Präzipitates zu erkennen, das im mittleren anodischen Bereich dicht neben der Antiserumrinne und parallel mit dieser verlief. Dieser Befund konnte in wiederholt durchgeführten Ansätzen nicht bestätigt werden.

Die Untersuchung der Modellkonserven 120°C ließ in keinem Fall mehr ein Präzipitat erkennen. Die Anfärbung der Antigenbassins war dagegen verstärkt gegenüber 100°C und 110°C.

Demnach war es mittels der Immunelektrophorese nicht möglich, unter den angegebenen Untersuchungsbedingungen und mit dem zur Verfügung stehenden, selbsthergestellten Antiserum Sojaproteinzusätze in Modellkonserven der Erhitzungsstufen 100°C, 110°C und 120°C nachzuweisen.
Sie gestattete jedoch eindeutig einen quantitativen Nachweis von Sojaprotein der geprüften Konzentrationen in auf 75°C erhitzten Modellbrühwürsten bei geringstem Antiserumverbrauch.

Tabelle 20

Leistungsfähigkeit der geprüften Verfahren

	75°C			100°C			110°C			120°C		
	i. H.	J-E.	Q.P.	i. H.	J-E.	Q.P.	i. H.	J-E.	Q.P.	i. H.	J-E.	Q.P.
0.1	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
0.2	+	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	+
0.3	+	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	+
0.4	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+
0.5	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+
075	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+
1.0	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+
1.5	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+
2.0	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+
3.0	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+
4.0	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+

Abschließend sind in Tabelle 20 noch einmal die wichtigsten Ergebnisse der Versuche zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein mittels der i.H., der I.E. und der Q.P. zusammengefaßt.

Bezüglich der höheren Nachweisgrenze in der Erhitzungsstufe 100°C sei auf die Ergebnisse, Punkt 2, auf Seite 93 verwiesen.

D. Diskussion

Antiserumherstellung:

Die durchgeführten Versuche zur Antiserumherstellung zeigen in anschaulicher Form die Schwierigkeiten, die sich der Gewinnung eines hochwertigen Anti-Sojaprotein-Serums in den Weg stellen. Diese Schwierigkeiten sind zum Teil allgemeiner Art und betreffen in gleicher Weise die Gewinnung von Antiseren gegen andere Fremdeiweiße, wie z.B. die individuell unterschiedliche Eignung der Versuchstiere für die Antikörperbildung. Auch die Verwendung von weitgehend einheitlichem Tiermaterial (reinrassige Geschwistertiere) führte hier nicht zu einer Verbesserung.
Mit diesem Ergebnis wird die schon vorherrschend geübte Praxis der Verwendung von Bastarden zur Serumgewinnung bestätigt. In der Literatur finden sich lediglich bei DEGENKOLB und HINGERLE (1967) und CATSIMPOOLAS und MEYER (1968) Angaben über die Verwendung rassereiner Tiere zur Anti-Sojaprotein-Serum-Herstellung.
Eine Abhängigkeit der Antikörperbildung von der Geschlechtszugehörigkeit der Versuchstiere wurde nicht festgestellt. Die allgemein übliche Bevorzugung männlicher Tiere (HERRMANN (1968)) kann daher zumindest in diesem Zusammenhang nicht unterstützt werden.
Die Mehrzahl der Autoren verwendete für ihre Immunisierungsversuche Kaninchen von 2,5 - 3,5 kg Körpergewicht bzw. einem Lebensalter von ca. 6 Monaten. Es zeigte sich in den eigenen Versuchen, daß die Verwendung schwererer und damit etwas älterer Tiere keine Nachteile in bezug auf die Serumqualität mit sich brachte; dagegen waren deutliche Vorteile bezüglich der gewonnenen Serumquantität und bezüglich der Widerstandsfähigkeit der Tiere festzustellen.

Die subcutane Verabreichung von großen Antigenmengen, wie sie von KOTTER, HERRMANN, RING und CORSICO (1966) und von DEGENKOLB und HINGERLE (1967) durchgeführt wurde, bewährte sich auch in den eigenen Versuchen.

Auch mit der intravenösen Immunisierungstechnik scheint ein brauchbares Antiserum gegen Sojaprotein herstellbar zu sein, wenn die Dosis gegenüber der bei Milcheiweiß empfohlenen Technik (SINELL und KLUGE-WILM (1968) erhöht wird.
Zur subcutanen Immunisierung wurden zwei unterschiedliche Aluminiumhydroxyde eingesetzt und in ihrer Wirksamkeit für die Antikörperbildung miteinander verglichen: das Präparat Nr. 1088 der Firma Merck - Darmstadt und das Präparat Nr. 12261 der Firma Serva - Heidelberg, die beide als C-gamma-Gel in Form von Bayerit und Hydrargillit vorlagen und dementsprechend als "gealtert" bezeichnet waren. Das Präparat der Firma Merck wird in Pulverform, das der Firma Serva als stabile, 2%ige, wäßrige Suspension gehandelt.
Die unter Verwendung dieser beiden Hilfsstoffe gesetzten, subcutanen Antigendepots zeigten nach beendeter Immunisierung starke Größenunterschiede. Depots, die mit $Al(OH)_3$ von Serva gesetzt worden waren, übertrafen diejenigen mit $Al(OH)_3$ von Merck um das Doppelte ihrer Größe. Die ersten 1 - 2 von 15 Depots einer Immunisierung waren bei der Verwendung von $Al(OH)_3$ von Merck am Ende des Immunisierungsvorgangs nach ca. 5 Wochen teilweise schon völlig resorbiert worden.
Die entzündliche Reaktion war in beiden Fällen gering und beschränkte sich auf eine verstärkte Blutfülle der Unterhautgefäße.
Da in beiden Fällen stets die gleiche Menge an Flüssigkeit und Trockensubstanz injiziert worden war, kann hieraus auf eine schnellere Resorption der mit $Al(OH)_3$ von Merck gesetzten Depots geschlossen werden. Das Präparat von Merck scheint demnach eine geringere Depotwirkung zu besitzen.

Trotz dieser auffälligen äußerlichen Unterschiede waren beide Präparate gleichwertig hinsichtlich ihres Einflusses auf die Höhe des Antikörperspiegels.
"Die Wirkungsweise von Metalladjuvantien kann" - wie KOTTER, HERRMANN, RING und CORSICO (1966) anhand mehrerer Quellen ausführen - "nicht mehr ausschließlich mit Depoteffekten erklärt werden; katalytische Vorgänge dürften neben einer

Molekülvergrößerung sogar dominieren".

Die eigenen Ergebnisse lassen ebenfalls eine überwiegende Katalysatorwirkung der zur Immunisierung eingesetzten Metalladjuvantien vermuten, da auch hier ein Zusammenhang zwischen Depotgröße und Antikörperbildung in keinem Fall bestand.

Die im Handel erhältlichen isolierten Sojaproteine besitzen etwas unterschiedliche serologische Eigenschaften. DEGENKOLB und HINGERLE (1967) wiesen darauf hin, daß die Unterschiede zwischen verschiedenen Fabrikaten einer Fremdeiweißart und darüber hinaus sogar der Unterschied verschiedener Chargen eines Fabrikats die quantitative Bestimmung der Fremdeiweiße beeinflussen können.
Nach Angaben von KLUGE-WILM (1967) sind diese Unterschiede bei aME-Präparaten unerheblich. HERRMANN (1968)* befürchtete, daß bei verschiedenen Sojaproteinpräparaten eine Kreuzimmunität nicht zu erreichen sein würde und prüfte deshalb die Möglichkeit der Herstellung eines polyvalenten Anti-Sojaprotein-Serums durch Immunisierung von Kaninchen mit unbehandeltem Sojavollmehl. Diese Frage wurde in den eigenen Versuchen zur Antiserumherstellung aufgegriffen. Dabei erwies sich naturbelassenes Sojavollmehl als wenig geeignet für die Antiserumherstellung gegen Sojaprotein. Wurde dagegen mit Sojaprotein immunisiert, so waren auch gegen Sojavollmehl gleicher Provenienz ausreichende Antikörpertiter festzustellen.

Eine weitere Aufgabe der Versuche zur Antiserumherstellung war es, verschiedene Antigenaufbereitungen und die sich daraus ergebende "thermische Reaktionsbreite" (d.h. die Reaktionsfähigkeit der gewonnenen Antiseren gegenüber unterschiedlich hoch erhitzten Testantigenen) in bezug auf Sojaprotein zu untersuchen. DEGENKOLB und HINGERLE (1965, 1967) vertreten die Ansicht, daß getrennte Antiseren gegen niedrig- und hocherhitztes Sojaprotein gewonnen werden müssen, während HERRMANN und KOTTER(1968) ein derartiges Vorgehen nicht für notwendig erachten; sie stellten nach der Vorschrift von SCHMIDT (1912) ein einheitliches Antiserum gegen ein Hitze-

Alkali-Präzipitat des Extraktes aus einer 10%igen Sojaproteinaufschwemmung her, der insgesamt 45 Min. auf 70°C erhitzt worden war. Das so gewonnene Antiserum soll eine ausreichende thermische Reaktionsbreite besitzen, die es gestattet , alle in der Fleischwarenherstellung üblichen Erhitzungsstufen zu erfassen.
Daß es möglich ist, ein Antiserum gegen Sojaprotein mit einem Reaktionsspektrum herzustellen, das gebrühtes, gekochtes und autoklaviertes Material umfaßt, konnte in den eigenen Versuchen zur Antiserumherstellung bestätigt werden.

Nach DEGENKOLB und HINGERLE (1965) ist bei den auf diesem Wege gewonnenen Antiseren gegen niedrig und hoch erhitztes Material tatsächlich eine weitgehende Beschränkung der Reaktionsfähigkeit auf das autologe Antigen festzustellen, wobei, wie DEGENKOLB und HINGERLE (1965) berichten, ein Antiserum gegen hoch erhitztes Material bei insgesamt geringerer Aktivität auch in abgeschwächter Form mit niedrig erhitztem Material reagiert, niemals jedoch ein Serum gegen niedrig erhitztes Antigen mit autoklaviertem Material.

Die eigenen Untersuchungen erbrachten sowohl mit der einheitlichen Antigenaufbereitung nach SCHMIDT (1912) wie auch mit der getrennten Antigenaufbereitung nach DEGENKOLB und HINGERLE (1965) brauchbare Antiseren gegen Sojaprotein.
Da jedoch aus Gründen der Arbeitsersparnis und im Hinblick auf eine anzustrebende Standardisierung der serologischen Untersuchungstechnik die Herstellung eines einheitlichen Antiserum gegen alle Erhitzungsstufen einen prinzipiellen Vorteil darstellt, sollte diesem Verfahren der Vorzug gegeben werden.

Die indirekte Hämagglutination (i.H.)

Die i.H. nach BOYDEN (1954) in der Modifikation nach HERRMANN (1963) wird von KOTTER, HERRMANN, ENOCH und anderen als die derzeit leistungsfähigste Methode zum serologischen Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen bezeichnet (1963, 1965, 1966, 1967, 1968, 1969)*. Die Veröffentlichungen dieser Autoren befassen sich mit dem quantitativen Nachweis von HE,

* Lit.-Verzeichnis Nr. 13,32,33,34,37,38,45,47,48

TBP und aME, jedoch wird die i.H. auch für den Nachweis von Sojaprotein als Methode der Wahl empfohlen.
Die i.H. hat sich in der klinischen Medizin den Ruf einer hochempfindlichen serologischen Arbeitsmethode erworben. Sie wurde dort als Nachweisverfahren vor allem für mikrobielle Antigene und deren Stoffwechselprodukte sowie für die durch sie hervorgerufenen Serumantikörper benutzt. Dieser ursprünglichen Form der Hämagglutination entspricht in der Modifikation nach HERRMANN nur noch die positive Serumkontrolle (Titerbestimmung); tatsächlich bestätigen die mit der i.H. meßbaren Serumtiter von 1 : 1 000 000 und mehr diese hohe Empfindlichkeit.
Die eigentliche serologische Reaktion beim Fremdeiweiß-Nachweis läuft jedoch in Abwesenheit der Erythrozyten in der Mischung von Antiserum und Antigenlösung während der Inkubierung ab. Das entstandene Präzipitat wird abzentrifugiert, und erst dann wird die im Verlauf der vorangegangenen Reaktion eingetretene Titerabschwächung mittels der Hämagglutination gemessen. Der dabei festgestellte Antikörpertiter und die in dem Reaktionsgemisch vorhandene Antigenmenge stehen zueinander in einem reziproken Verhältnis. Die Hämagglutination wird damit zu einem Negativbild der Präzipitation, das allerdings nur eine stufenweise Ablesung und Auswertung gestattet; gebräuchlich ist der Verdünnungsfaktor 2, das bedeutet eine 50%ige Abnahme bzw. 100%ige Zunahme der Antikörpermenge von einer Stufe zur nächsten. DEGENKOLB und HINGERLE (1967) betrachten diese Eigenschaft der i.H. als prinzipiellen Nachteil gegenüber der Präzipitation, deren Genauigkeit durch die nachgeschaltete Hämagglutination nicht verbessert, sondern eher beeinträchtigt werden kann.

Das System der i.H. nach HERRMANN ist durch die Zweiteilung in eine konzentrationsabhängig verlaufende Präzipitationsreaktion und eine darauffolgende Indikatorreaktion mit einer weiteren nicht zu übersehenden Fehlermöglichkeit belastet: Im Gegensatz zu anderen serologischen Reaktionen nimmt die i.H. keine Rücksicht auf die thermische Reaktionsbreite des Anti-

serums. Es ist bekannt, daß sich die serologische Spezifität nicht nur auf homologe Reaktionspartner, sondern auch auf hitzemodifizierte (autologe) Antigene und deren Antikörper beschränken kann. Das gilt besonders für Muskelproteine (SINELL (1960, 1969)), aber auch für Fremdeiweiße und unter diesen stärker für das Sojaprotein als für aME (DEGENKOLB und HINGERLE (1965, 1967)). Im Verlauf einer i.H. muß mit einem Antiserum a) autoklaviertes Material quantitativ erfaßt und b) die verbleibende Antikörpermenge mit nativem, an die Erythrozyten angeheftetem Antigen austitriert werden. Obwohl die nach SCHMIDT (1912) erzeugten Antiseren mit größerer thermischer Reaktionsbreite diesen Nachteil meist nicht aufweisen, bleibt doch die Tatsache bestehen, daß andere serologische Reaktionen nicht mit diesem prinzipiellen Nachteil belastet sind. Die Meinung von DEGENKOLB und HINGERLE (1967), daß die i.H. aus den genannten Gründen nicht in der Lage sein kann, genauere Ergebnisse als eine direkt meßbare Präzipitation zu geben, wird in den eigenen Versuchen zur quantitativen Bestimmung von Sojaprotein in Modellbrühwürsten 75°C bestätigt. Mit Hilfe der i.H. ließ sich Sojaprotein in den Modellbrühwürsten ab 0,2 % nachweisen. Mit Hilfe der beiden anderen geprüften Verfahren, der Präzipitatmessung und der I.E., gelang der Nachweis dieser Fremdeiweißmenge ebenfalls, mit Hilfe der Präzipitatmessung sogar ab 0,1 % Sojaproteinzusatz. Zwar deutet sich in der i.H. (Tabelle 16) bei einem Zusatz von 0,1 % eine Veränderung in der Reaktionsintensität an (+ gegen +++ der neg. Kontrolle), doch kann von einer Titerabschwächung noch nicht gesprochen werden, da bis zur nächsten Verdünnungsstufe die Kriterien einer positiven Hämagglutination gegeben sind. Hier wird der Nachteil der Einteilung in Titerstufen deutlich. Die Präzipitatmessung dagegen registriert bereits diese schwache Antigen-Antikörper-Reaktion (siehe Abb. 9 und 10).

Die größte Schwierigkeit beim Arbeiten mit der i.H. bereitet die Vorbereitung der Hammelerythrozyten für die Indikatorreaktion. Abgesehen von dem Arbeitsaufwand, der hiermit verbunden ist, ist eine stets gleichmäßige Beladung der Erythrozyten mit dem Antigen nur schwer zu erreichen. Das wurde

in den eigenen Versuchen sehr deutlich. Dieser komplizierte Vorgang ist mit sehr vielen Imponderabilien belastet und vermutlich die Hauptursache für die mangelhafte Reproduzierbarkeit einzelner guter Erfahrungen mit dieser Methode. Möglicherweise führt die von KOTTER und HERRMANN (1969) angekündigte Umstellung ihres Verfahrens auf sensibilisierte Latexpartikel zu einer Verbesserung.

Quantitative Präzipitatmessung:

Die Präzipitatmessung nach DEGENKOLB und HINGERLE (1965, 1967) erwies sich als gangbarer Weg zur quantitativen Bestimmung von Sojaprotein in Fleischwaren.
Für die eigenen Versuche wurden einige geringfügige Änderungen des Originalverfahrens nötig; so zeigte sich, daß die angegebene Bebrütungszeit des Extraktionsgemisches von 30 Minuten auf eine Stunde heraufgesetzt werden mußte. Erst nach dieser Bebrütungszeit konnten genügend starke Präzipitationen festgestellt werden. DEGENKOLB und HINGERLE verlangen von ihren Antiseren neben einem hohen Antikörpertiter auch eine besonders hohe Reaktionsgeschwindigkeit; schon 5 Minuten nach der Mischung von Antigen und Serum soll sich eine Reaktion erkennen lassen. Diese Forderung wurde von den eigenen Antiseren nicht erfüllt.

DEGENKOLB und HINGERLE(1965, 1967) geben für die quantitative Präzipitatmessung einen Serumbedarf von 0,6 ml pro Untersuchungsextrakt an. In den eigenen Versuchen war 1 ml Antiserum pro Untersuchungsextrakt zur Ausbildung gut meßbarer Präzipitatmengen erforderlich. Die Ursache ist auch hier wieder in der unterschiedlichen Serumqualität zu suchen. Eine Überprüfung der Methode mit von DEGENKOLB hergestellten Anti-Sojaprotein-Seren war leider nicht möglich.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die engkalibrigen Schmelzpunktbestimmungsröhrchen zur Darstellung der Präzipitatmenge besser geeignet sind als die zu weitlumigen Präzipitatmeßröhrchen. Die Schmelzpunktbestimmungsröhrchen waren nicht konstant kalibriert, d.h. ihr Lumen schwankte zwischen Werten von 1,0 und 1,4 mm. Sie waren nicht nur untereinander,

sondern auch in sich von wechselndem Durchmesser. Diese Schwankungen führten zu Unstetigkeiten im Verlauf der Präzipitatkurven. Sicherlich läßt sich hier durch Röhrchen mit konstantem Innendurchmesser von 1,0 mm eine merkliche Verbesserung der Genauigkeit erreichen.
Zweifellos erwies sich die Q.P. unter den geprüften Methoden als gleichwertig, wenn nicht als besonders geeignet. Dennoch dürfte der hohe Antiserumverbrauch einer allgemeinen Einführung der Q.P. in die Routinediagnostik bis auf weiteres entgegenstehen.

Immunelektrophorese (I.E.):

KLUGE-WILM (1967) und SINELL und KLUGE-WILM (1968) benutzten die I.E. mit Erfolg zum quantitativen Nachweis von aME in Fleischwaren, wobei besonders auf die Eignung der Methode für die Untersuchung von hoch erhitzten Fleischwaren hingewiesen wurde.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Eignung der I.E. in der angegebenen Methodik auch für den Nachweis von Sojaprotein in Fleischwaren zu überprüfen.
Es gelang, zu zeigen, daß in niedrig erhitztem Material (75°C) eine quantitative Erfassung mit Hilfe der I.E. möglich und in dieser Erhitzungsstufe den konkurrierenden Methoden leistungsmäßig zumindest gleichwertig, teilweise überlegen und aufgrund ihrer außerordentlichen Wirtschaftlichkeit für Routineuntersuchungen besonders geeignet ist.
In den höheren Erhitzungsstufen dagegen war ein Nachweis von Sojaprotein mit Hilfe der I.E. nicht möglich.
Aus verschiedenen Anzeichen, so z.B. der verstärkten Anfärbung der Antigenbassins bei Untersuchungen von Extrakten aus Modellkonserven mit steigenden Sojazusätzen, kann geschlossen werden, daß eine spezifische serologische Reaktion in Form einer Präzipitation stattgefunden hat; die verwendete Anordnung führte hier jedoch nicht mehr zu einer Auftrennung und Bewegung der Antigene im elektrischen Feld.

Vergleichende Bewertung und Gegenüberstellung der drei geprüften Verfahren

Die Bewertung der Praxisreife eines Verfahrens muß anhand mehrerer Kriterien erfolgen, wobei Leistungsfähigkeit und Wirtschaftlichkeit entscheidende Gesichtspunkte sind. In den meisten Fällen wird eine Bewertung einen Kompromiß zwischen diesen beiden Faktoren darstellen.

a) Leistungsfähigkeit

Das einzige der drei geprüften Verfahren, mit dem in allen Erhitzungsstufen ein Nachweis von Sojaproteinzusätzen möglich war, ist die quantitative Präzipitatmessung nach DEGENKOLB und HINGERLE. Lediglich in der niedrigsten Erhitzungsstufe der bei 75°C erhitzten Modellbrühwurst war auch mit i.H. und I.E. ein Nachweis von Sojaprotein möglich. Aus diesem Grund muß sich eine Bewertung der Genauigkeit der quantitativen Aussage auf die Untersuchung der Modellbrühwurst beschränken; hierbei ist wiederum die quantitative Präzipitatmessung am höchsten zu bewerten, da mit ihr schon Zusätze von 0,1 % nachgewiesen werden konnten; mit der i.H. und der I.E. waren erst Zusätze ab 0,2 % zu erfassen.
Die Abstufung der Zusatzmengen war mit der quantitativen Präzipitatmessung besonders in den niedrigen Konzentrationen unübertroffen, während die I.E. den beiden anderen Verfahren in der Abgrenzung von Zusätzen über 1,5 und 2,0 % überlegen war.
In den höheren Erhitzungsstufen 100°C, 110°C und 120°C, in denen i.H. und I.E. versagten, war die Präzipitatmessung noch zu einer quantitativen Abstufung in der Lage.
Die Nachweisgrenze für Sojaprotein in Modellkonserven 120°C mit Hilfe der Präzipitatmessung lag bei 0,2 % (siehe auch Tab. 20).

b) Wirtschaftlichkeit

Die Eignung einer Methode für ihren Einsatz als Routineuntersuchung richtet sich darüber hinaus auch nach dem zu ihrer Durchführung erforderlichen Material- und Zeit-

aufwand.
Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von Modellfleischwaren befassen sich ausschließlich mit der quantitativen Untersuchung auf Sojaprotein. Sie berücksichtigen nicht die bei den verschiedenen Untersuchern üblichen und vornehmlich der Einschränkung des Serumverbrauchs dienenden qualitativen Auswahluntersuchungen, die im übrigen jeder der drei geprüften quantitativen Methoden nach Belieben vorgeschaltet werden können. Der hohe Serumverbrauch zur Ermittlung der Eichkurven ist bei der Bewertung der Wirtschaftlichkeit ebenfalls nicht berücksichtigt worden. Einerseits ist die Eichkurvenermittlung mühsam und außerordentlich teuer, andererseits sind gerade Eichkurven geeignet, bei einer breiten Routineanwendung zu einer Einsparung von Antiserum beizutragen. Im übrigen sind Eichkurven in diesem Zusammenhang nur für die i.H. und Präzipitatmessung verwendbar.

Die wirtschaftlichste Methode ist zweifellos die I.E. Sie ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von 18 bzw. 36 Extrakten mit nur 1,8 ml Antiserum. Die I.E. ist darüber hinaus nicht als arbeitsintensiv zu bezeichnen, obwohl mit einem Ergebnis erst am 4. Tag oder (falls Lyophilisation und Dialyse durchgeführt werden müssen) erst am 6. Tag nach Eingang des Untersuchungsmaterials gerechnet werden kann.

Diese Einsparung an Antiserum, die ja vor allem die Wirtschaftlichkeit ausmacht, ist bei i.H. und Präzipitatmessung auch durch Vorschaltung qualitativer Auswahluntersuchungen nicht zu erreichen. Die eigenen Versuche zeigten, daß i.H. und Präzipitatmessung im wesentlichen einen gleich hohen Einsatz an Antiserum erfordern, nämlich 1 ml pro Untersuchungsextrakt. Die Zahl der notwendigen Kontrollen ist allerdings bei der Präzipitatmessung geringer: sie benötigt für jeden Ansatz nur eine Extraktkontrolle (neg. Modellwurst) gegenüber drei Kontrollen (pos. Serumkontrolle, neg. Serumkontrolle und Extraktkontrolle) bei der i.H.
Ein weiterer Vorteil der Präzipitatmessung besteht in dem geringen Arbeits- und Zeitaufwand; sie ermöglicht das Ablesen

der Ergebnisse noch am selben bzw. (bei Lyophilisation) folgenden Tag nach Eingang des Untersuchungsmaterials.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erwies sich die quantitative Präzipitatmessung der indirekten Hämagglutination und der Immunelektrophorese bei dem Nachweis von Sojaprotein in Fleischwaren als überlegen.

Gemeinsame Problematik fremdeiweißserologischer Methoden

Allen in der Fremdeiweißserologie üblichen Verfahren ist das Problem der Antiserumherstellung gemein. Die Praxisreife aller Nachweismethoden erfährt hier eine Einschränkung, solange die Antiseren nicht standardisiert und die Ergebnisse nicht reproduzierbar sind.
Aber auch andere Probleme beeinträchtigen die Übereinstimmung der auf serologischem Wege erarbeiteten Ergebnisse, wie z.B. das Fehlen einer genügend leistungsfähigen und vor allen Dingen einheitlichen Extraktionstechnik.
Analytische Schwierigkeiten für die in der Überwachung tätigen Institutionen entstehen u.a. auch durch verschiedene technologische Manipulationen, die die Nachweisbarkeit von Fremdeiweißen erschweren. Es ist dem Hersteller einer Dosenbrühwurst im Rahmen der Fleisch-VO überlassen, seine auf 100°C erhitzten Brühwürstchen mit einer auf 120°C vorerhitzten und zusätzlich mit Speck zu einer stabilen Emulsion verarbeiteten Fremdeiweißaufbereitung herzustellen, solange er die Deklarationspflicht und Mengenbegrenzung beachtet. Die Untersuchung eines solchen Produktes mit Hilfe serologischer Methoden wird wahrscheinlich andere Ergebnisse zeitigen, als wenn das gleiche Erzeugnis mit unerhitztem, trocken zugemischtem Fremdeiweiß hergestellt worden wäre. DEGENKOLB und HINGERLE (1967), BOCKSCH (1965) sowie KOTTER, PALITZSCH und FISCHER (1969) weisen auf die Schwierigkeiten hin, die die Verarbeitung stabiler Emulsionen für den Fremdeiweißnachweis bedeuten. Schon der Zeitpunkt des Zusetzens des trockenen Fremdeiweißes zum Fleisch, entweder schon beim Vorsalzen oder erst während des Kutterns, hat unter-

schiedliche Wasserbindungs- und Emulgierungseffekte zur Folge und ist demnach auch in der Lage, die Extrahierbarkeit des Fremdeiweißes aus dem fertigen Produkt zu beeinflussen.

Zur Standardisierung des Extraktionsvorgangs machen DEGENKOLB und HINGERLE (1967) den Vorschlag, im Anschluß an eine Feuchtigskeits- und eine Fettbestimmung die erforderliche Menge an Extraktionsflüssigkeit pro Gewichtseinheit des Untersuchungsmaterials anhand einer einfachen Formel individuell zu berechnen und damit nicht nur der unterschiedlichen Zusammensetzung der Produkte, sondern auch den Vorschriften der Fleisch-VO Rechnung zu tragen, die eine Beurteilung der Höhe des Fremdeiweißzusatzes im Verhältnis zur verwendeten Fleisch- und Fettmenge verlangt.

Quantitative Aussagen über den Fremdeiweißgehalt lassen sich nur dann machen, wenn das Untersuchungsergebnis auf bekannte Größen bezogen werden kann. Diese Bezugsgrößen können entweder als Eichkurven oder in Form von Vergleichsuntersuchungen entsprechender Modellerzeugnisse geschaffen werden. Zwar besteht kein prinzipieller Unterschied zwischen Eichkurve und simultaner Vergleichsuntersuchung, da es sich bei der letzteren lediglich um eine auf den Einzelfall beschränkte "kleine Eichkurve" aus wenigen Werten handelt, doch ist die Benutzung von Eichkurven im herkömmlichen Sinne an und für sich schon problematisch, denn sie betrachtet einmal ermittelte Werte als Vergleichsgrößen und nimmt damit definierte Versuchsbedingungen vorweg. Ein wesentlicher Faktor dieser Versuchsbedingungen ist das verwendete Antiserum. Daher verlieren Eichkurven ihre Gültigkeit, sobald ein anderes Antiserum benutzt wird.
Die simultane Vergleichsuntersuchung verlangt demgegenüber lediglich innerhalb eines Ansatzes die Verwendung desselben Antiserums für alle untersuchten Extrakte mit bekanntem und unbekanntem Fremdeiweißgehalt.

Die Betrachtung dieser gemeinsamen Probleme aller serologischen Fremdeiweißnachweise, wie auch chemischer Methoden, läßt selbst bei leistungsfähigen Verfahren bezüglich ihres Wertes für die breite Routineanwendung Zurückhaltung angebracht erscheinen.

E. Zusammenfassung

In Versuchen zur Herstellung von Antiserum gegen Sojaprotein wurden verschiedene Antigene, Antigenaufbereitungen, Adjuvantien und Immunisierungsverfahren untersucht; die gewonnenen Antiseren wurden mit Hilfe der Ringpräzipitation und der indirekten Hämagglutination gegen verschiedene Erhitzungsstufen von Sojaprotein getestet.

Als geeignetes Verfahren zur Herstellung von Antiserum gegen Sojaprotein erwies sich die subcutane Immunisierung von Kaninchenbastarden mit einem Hitze-Alkali-Präzipitat nach W.A. SCHMIDT unter Verwendung von Aluminiumhydroxyd als Adjuvans.

An Modellbrühwürsten (75°C) und Modellkonserven (100°C, 110°C, 120°C) eigener Herstellung mit Sojaproteinzusätzen von 0,1 bis 4 % wurden die folgenden Verfahren mit selbstgewonnenen Antiseren auf ihre Eignung als quantitative Nachweismethode für Sojaprotein vergleichend überprüft:

Indirekte Hämagglutination nach KOTTER und HERRMANN
Quantitative Präzipitatmessung nach DEGENKOLB und HINGERLE
Immunelektrophorese nach SINELL und KLUGE-WILM.

Die quantitative Präzipitatmessung erwies sich als das beste der geprüften Verfahren. Während die indirekte Hämagglutination und die Immunelektrophorese nur in der auf 75°C erhitzten Modellbrühwurst einen quantitativen Nachweis zuließen, erlaubte sie einen quantitativen Nachweis von Sojaprotein auch in Modellkonserven, die bis auf 120°C erhitzt wurden.
Der hohe Antiserumverbrauch der quantitativen Präzipitatmessung dürfte jedoch einer allgemeinen Einführung in die Routinediagnostik entgegenstehen.

F. Literaturverzeichnis

1 BECHT, H.: (1958)
Die indirekte Hämagglutinationsreaktion zur Feststellung der Brucellose
Zbl.Vet.Med. 5, 909

2 BOCKSCH, W.: (1965)
Isoliertes Sojaeiweiß, ein möglicher Hilfsstoff für lang zu lagernde Brühwurstkonserven
Fleischwirtschaft 45, 779

3 BOYDEN, S.V. u. P. GRABAR: (1954)
Rôle des lipides dans la sensibilisation des erythrocytes par les constituants de la tuberculine
Ann.Inst.Pasteur 87, 257

4 BOYDEN, S.V.: (1951)
The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein Sera
J.Exper.Med. 93, 107

5 BRODHAGE, H. u. BOURGEOIS, E.: (1954)
Die Hämagglutinationsreaktion nach Middlebrook und Dubos bei der Rindertuberkulose
Mh.Tierhk. 6, 78

6 BRODHAGE, H. u. H. FEY: (1955)
Beobachtungen bei der Hämagglutinationsreaktion auf Bang und Tuberkulose mit menschlichen und tierischen Sera
Z.Hyg. 141, 76

7 CATSIMPOOLAS, N. u. E.W. MEYER: (1968)
Immunochemical studys of Soybean Proteins
J.Agr.Food Chem. Vol. 16, 128

8 DEGENKOLB, E.: (1965)
Zur aktuellen Untersuchung von Lebensmitteln
Wehrdienst Gesundh. 14, 284

9 DEGENKOLB, E. u. M. HINGERLE: (1967)
Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen
Arch.Lebensmittelhyg. 18, 241

10 DEGENKOLB, E. u. M. HINGERLE: (1969)
Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen
Arch.Lebensmittelhyg. 20, 73

11 EGLI, R.H.: (1965)
Einfluß des Erhitzens auf die Bestandteile der Lebensmittel
Dechema-Monographien, 131

12 EHRLICH, J.: (1948)
Beitrag zum mikroskopischen Nachweis von Soja und Zeralien, wie Roggen, Gerste und Hafer in Wurst und Wurstkonserven
Vet.med.Diss. Hannover

13 ENOCH, Ch.: (1967)
Zur biologischen Differenzierung von Trockenblutplasma in hocherhitzten Fleischwaren
Vet.med.Diss. München

14 FANGAUF, K.W.: (1965)
Soja und Sojaprodukte
In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 3. Aufl., Urban u. Schwarzenberg, München - Berlin

15 FINGER, M.: (1964)
Das Freund'sche Adjuvans. Wesen und Bedeutung
G. Fischer, Stuttgart

16 FLEISCHMANN, O.: (1966)
Nachweis von Soja-Protein in Fleischwaren
Fleischwirtschaft 46, 172

17 FRANK, S.S. u. S.J. CIRCLE: (1959)
The use of isolated soybean protein for non-meat, simulated sausage products Frankfurter und Bologna Types
Food Technol. 13, 307

18 FREIMUTH, U. u. W. KRAUSE: (1969)
Nachweis fremder Eiweißkörper in Fleischwaren
GDCh-Mittlg. 24, 8

19 FROMM, G.: (1964)
Zum iimunologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischkonserven
Arch.Hyg. 151, 702

20 FROMM, G., J. LANGHELD, J. WURZIGER: (1964)
Zum Nachweis von Fleischkonserven-Verfälschungen
Arch.Hyg. 148, 244

21 GRABAR, P. u. P. BURTIN: (1964)
Immunelektrophoretische Analyse
Elsevier, Amsterdam

22 GRABAR, P. u. C.A. WILLIAMS: (1953)
Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d' un mélange de protéines
Biochim.Biophys.Acta 10, 193

23 GÜNTHER, H.: (1969)
Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren
Arch.Lebensmittelhyg. 20, 97 u. 128

24 HANSON, L.A.: (1964)
Immunological technique for the detection of milk proteins in food products
Nord.Vet.med. 16, 201

25 HAUROWITZ, F.: (1935)
Dilatometrische Untersuchungen der Hitzedenaturierung von Eiweißlösungen
Kolloid-Z. 71, 198

26 HAUROWITZ, F.: (1969)
Struktur und Wirkungsweise der Antikörper
Naturwiss. 56, 189

27 HELLER, G., A.S. JACOBSON, M.H. KOLODNY, W.H. KAEMMERER: (1954)
The Hemagglutination Test for Rheumatoid Arthritis
II. The influence of Human Plasma Fraction II
J.Immunol. 72, 66

28 HELLMANN, E. u. E, QUENTIN: (1968)
Zum Nachweis der Verarbeitung von frischem Hühnereiklar in Brühwürsten mit Hilfe der Präzipitationsreaktion
Berliner Münchener Tierärztl.Wschr. 22, 444

29 HENNEBERG, O.H.: (1942)
Über die Haltbarkeit von Würsten, deren Brät Sojamehl zugesetzt wurde
Wien.Tierärztl.Mschr. 29, 145

30 HENNEBERG, O.H.: (1942)
Soja in Lebensmitteln tierischer Herkunft
1.Mitt.: Soja-Nachweis in UV-Licht
Tierärztl.Rdsch. 48, 304

31 HENNEBERG, O.H.: (1942)
Soja in Lebensmitteln tierischer Herkunft
2.Mitt.: Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Soja in Fleischwaren mit Hilfe von Coriphosphin "H"
Tierärztl.Rdsch. 48, 334

32 HERRMANN, Ch.: (1963)
Über den Nachweis von hitzedenaturiertem Hühnereiklar in Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination
Vet.med.Diss. München

33 HERRMANN, Ch.: (1965)
Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination
Vortrag, gehalten auf dem 11. Europ. Kongreß der Fleischforscher vom 16.-21.8. in Belgrad

34 HERRMANN, Ch.: (1965)
Über die zugleich quantitative Differenzierung von erhitztem Eiweiß mittels der indirekten Hämagglutination
Berliner Münchener Tierärztl.Wschr. 78, 370

35 HERRMANN, Ch.: (1968)
Gewinnung von Antiseren für den Nachweis von Fremdeiweiß in hocherhitzten Fleischerzeugnissen
Arch.Lebensmittelhyg. 19, 270

36 HERRMANN, Ch.: (1968)
Persönliche Mitteilung

37 HERRMANN, Ch., D. HOLPERT, G. PFEIFFER: (1968)
Zur serologischen Erfassung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischerzeugnissen
Arch.Lebensmittelhyg. 19, 12

38 HERRMANN, Ch., u. L. KOTTER: (1968)
Serologische Verfahren bei der Überwachung von Fleischerzeugnissen
Arch.Lebensmittelhyg. 19, 265

39 HILSCHMANN, N.: (1969)
Die molekularen Grundlagen der Antikörperbildung
Naturwissensch. 56, 195

40 HOLPERT, D.: (1968)
Zum histologischen und immunchemischen Nachweis von Milcheiweiß in Brühwürsten
Vet.med.Diss. München

41 HOLTHÖFER, H., A. JUCKENACK, K.-H. NÜSE: (1963)
Deutsches Lebensmittelrecht Bd. 2
Heymanns, Berlin, S. 301 u. 327

42 KEOGH, E.V., E.A. NORTH, M.F. WARBURTON: (1947)
Hemagglutinines of the Hemophilus group
Nature 160, 63

43 KLEIN, W. u. H. WEISS: (1966)
Zur biologischen Wertigkeit von Sojaeiweiß
Fleischwirtschaft 46, 392

44 KLUGE-WILM, R.: (1967)
Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren
Vet.med.Diss. Berlin

45 KOTTER, L., Ch. HERRMANN, J. CORSICO: (1966)
Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination
Z.Lebensm.-Untersuch.Forsch. 133, 15

46 KOTTER, L., Ch. HERRMANN, C. RING, G. CORSICO: (1966)
Untersuchungen zur Steigerung der Antikörperbildung gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen
Zbl.Vet.Med. Reihe B, 15, 613

47 KOTTER, L. u. Ch. HERRMANN: (1968)
Die indirekte Hämagglutination als Nachweisreaktion für Fremdeiweiße
Arch.Lebensmittelhyg. 19, 267

48 KOTTER, L. u. Ch. HERRMANN: (1969)
Methoden zum Nachweis von Fremdeiweiß nach serologischen Verfahren
Fleischwirtschaft 49, 1175

49 KOTTER, L., A. PALITZSCH, Ch. HERRMANN: (1968)
Technologische Bedeutung von Fremdeiweiß bei der Fleischwarenverarbeitung
Arch.Lebensmittelhyg. 19, 261

50 KOTTER, L., A. PALITZSCH, A. FISCHER : (1969)
Weitere Studien über die Vorgänge bei der Herstellung von Brühwurst und die Wirkung verschiedener Hilfsstoffe
Fleischwirtschaft 49, 1623 u. 1633

51 KRAUS, R. u. St. LUDWIG: (1902)
Über Bakteriohämagglutinine und Antihämagglutinine
Wien.Klin.Wschr. 23, 120

52 KUTSCHER, W. u. D. LANGENAU: (1965)
Über die biologische Wertigkeit von Soja-Eiweiß und aufgeschlossenem Milcheiweiß. - Eine kritische Betrachtung -
Fleischwirtschaft 45, 1432

53 KUTSCHER, W., W. NAGEL, W. PFAFF: (1961)
Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen
Z.Lebensm.-Untersuch.Forsch. 115, 117

54 MIDDLEBROOK, G. u. R. DUBOS: (1948)
Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli
J.Exper.Med. 88, 521

55 MIERMEISTER, A.: (1942)
Nachweis und Bestimmung von Sojamehl in Wurstwaren
Z.Lebensm.-Untersuch.Forsch. 84, 392

56 MÜLLER, F.W. u. W. WÄCHTER: (1969)
Der Nachweis von Hühnereiklar in Wurstwaren durch die Bestimmung der Aminozucker
Dtsch.Lebensm.Rdsch. 5, 139

57 NETER, E.: (1956)
Microbial hemagglutination as an immunological technic
Amer.J.Clin.Path. 26, 165

58 NETER, WESTPHAL, LÜDERITZ, GORZYNSKI: (1956)
The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to enterobacteriaceae
Ann. N.Y. Ac.Sci. 66, 141

59 NEUBERT, G. u. H. BETHKE: (1968)
Zur Morphologie und Struktur von Aluminiumhydroxid. Elektronenmikroskopische Befunde
Zbl. Bakt. I. Orig. 206, 462

60 NIEMEYER, H.: (1942)
Der Sojazusatz zu den Kochwurstarten und sein Nachweis durch die histologische Untersuchung
Vet.med.Diss. Hannover

61 OBARA, T. u. M. KIMURA: (1967)
Gelfiltration fractionation of the whole water extractable soybean proteins
J. Food Sci. 32, 531

62 OBERMAYER, F. u. E.P. PICK: (1906)
Über die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Antikörper
Wien.klin.Wschr. 27, 327

63 OLSMAN, W.J.: (1967)
Electrophoretic detection of non meat proteins in meat products
13. European Meeting of Meat Research Workers, Rotterdam

64 OUCHTERLONY, Ö.: (1958)
Diffusion-in-gel-methods for immunological analysis. I
Progr. Allergy 5, 1

65 OUCHTERLONY, Ö.: (1962)
Diffusion-in-gel-methods for immunological analysis. II
Progr. Allergy 6, 30

66 OUDIN, J.: (1949)
La diffusion d' un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues. Etude quantitative des trois principales variables
Comptes rend.Acad.Sci. 228, 1890

67 RING, Ch.: (1964)
Vermehrte Bildung von Antikörpern gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen
Vet.med.Diss.,München

68 ROSENBERG, R.: (1926)
Versuche zur Artdifferenzierung von gekochtem Eiweiß mittels der Präzipitinreaktion
Zbl.Bakt. I. Orig. 98, 259

69 ROSENBERG, R.: (1928)
Eine Methode der präzipitatorischen Eiweißdifferenzierung von stark gekochtem Fleisch
Zbl.Bakt. I. Orig. 107, 448

70 SANG, J.H. u. W.R. SOBEY: (1954)
The Genetic Control of Response to Antigenic Stimuli
J. Immunol. 72, 52

71 SCHEIDEGGER, J.J.: (1955)
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorése
Int.Arch.Allergy 7, 103

72 SCHEIFFARTH, F., G. BERG, W. FRENGER: (1956)
Neuere Methoden zum Nachweis und zur Lokalisation von Antikörpern
Klin.Wschr. 34, 134

73 SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ, W. FRENGER: (1956)
Möglichkeiten und Grenzen der Immunelektrophorese
Ärztl.Wschr. 11, 573

74 SCHMIDT, H.: (1955)
Fortschritte der Serologie
2.Aufl. Steinkopff, Darmstadt, S. 364 u. 744

75 SCHMIDT, W.A.: (1907)
Untersuchungen über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiß-Antisera für die Fleischdifferenzierung
Biochem.Z. 5, 422

76 SCHMIDT, W.A.: (1908)
Studien über Präzipitinreaktion und erhitzte Eiweißstoffe
Biochem.Z. 14, 294

77 SCHMIDT, W.A.: (1912)
Über ein Präzipitin, welches es ermöglicht, auch gekochtes (unlösliches) Eiweiß zu differenzieren
Z.Immun.Forsch. 13, 166

78 SCHNECK, A. u. M. ZIEGLER: (1938)
Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Wurstwaren
Vorratspflege u. Lebensmittelforsch. 1, 494

79 SINELL, H.-J.: (1961)
Versuch zum Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine
Zbl.Vet.Med. 8, 57

80 SINELL, H.-J.: (1961)
Zum serologischen Nachweis von Wurstfälschungen
Berliner Münchener Tierärztl.Wschr. 74, 107

81 SINELL, H.-J.: (1962)
Verarbeitung von Hühnereiweiß in Brühwurst
Berliner Münchener Tierärztl.Wschr. 75, 48-51

82 SINELL, H.-J.: (1968)
Probleme bei der Spezies-Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln
Arch.Lebensmittelhyg. 19, 121

83 SINELL, H.-J. u. R. KLUGE-WILM: (1968)
Immunelektrophoretischer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen und Versuche zu einer quantitativen Auswertung
Zbl.Vet.Med. Reihe B, 15, 802

84 SINELL, H.-J. u. H.J. LANGNER: (1966)
Beitrag zur Identifizierung der Tierartzugehörigkeit von Fleisch in Fleischkonserven
Fleischwirtschaft 46, 34

85 SINELL, H.-J. u. I. MENTZ: (1969)
Serologische Spezies-Identifizierung hitzedenaturierter Muskelproteine mittels Harnstoffextraktion
Berliner Münchener Tierärztl.Wschr. 82, 55

86 SMITH, A.K.: (1966)
Grundlagen des Stickstoff-Protein-Umrechnungskoeffizienten für Soja-Protein, bezogen auf den Nährwert
Fleischwirtschaft 46, 1106

87 STAVITZKY, A.B.: (1954)
Micromethod for the study of proteins and antibodies. I u. II
J. Immunol. 72, 360 u. 368

88 STAVITZKY, A.B. u. E.R. ARQUILLA: (1955)
Micromethod for the study of proteins and antigens. III
J.Immunol. 74, 306

89 TISELIUS, A.: (1937) (1938)
Electrophoresis of serum globulin. I
Biochem. J. 31, 313
Kolloid-Z. 85, 129

90 UHLENHUTH, P.: (1901)
Die Unterscheidung des Fleisches verschiedener Tiere mit Hilfe spezieller Sera und die praktische Anwendung der Methode in der Fleischbeschau
Dtsch.med.Wschr. 27, 780

91 UHLENHUTH, P. u. W. SEIFFERT: (1930)
Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Präzipitation
In: Kolle-Kraus-Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Microorganismen
G. Fischer, Jena, Bd. 3/I, S. 365

92 WADSWORTH, C. u. L.A. HANSON: (1960)
Comparative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique
Int.Arch.Allergy 17, 165

93 WARNECKE, M.O. u. R.L. SAFFLE: (1968)
Serological Identification of Animal Proteins
1. Mode of Injection and Protein Extracts for Antibody Production
J.Food Sci. 33, 131

94 WILLIAMS, C.A. u. P. GRABAR: (1955)
Immunelectrophoretic studies on serum proteins. I - III
J.Immunol. 74, 158, 397 u. 404

95 WURZIGER, J. u. G. HENSEL: (1969)
Zur Fleischartbestimmung aus Fettbestandteilen und Fettbegleitstoffen
Fette, Seifen, Anstrichmittel 71, 144

96 WYLER, O. u. J.J. SIEGRIST: (1965)
Einfache, empfindliche Nachweismethode für fleischfremde, tierische Eiweißarten
Mitt. Geb.Lebensmittelunters.Hyg. 56/4, 299

Ich erlaube mir, nach Abschluß der fast zweijährigen Arbeiten, dem Leiter der Abteilung Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes, Herrn Ltd. Dir. und Prof. Dr. D. Großklaus für die Ermöglichung und intensive Förderung der Bearbeitung dieses aktuellen Themas und dem Direktor des Instituts für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin, Herrn Prof. Dr. H.-J. Sinell, für die Übernahme des Referates zu danken.
Beiden Herren möchte ich darüber hinaus für ihre jederzeit gewährte Unterstützung in fachlichen, organisatorischen und persönlichen Fragen danken.

Nicht unerwähnt bleiben darf das meiner Arbeit sehr förderliche, ersprießliche Arbeitsklima an der Abt. Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes, wofür allen Damen und Herren dieser Abteilung an dieser Stelle herzlich gedankt sei.

Lebenslauf

Am 3. 11. 1941 wurde ich, Hartmut, Kurt, Jürgen Krüger, als Sohn des Sportlehrers Siegfrid Krüger und seiner Ehefrau Brigitte geb. Jaenicke in Landsberg/Warthe geboren.
Im Zuge der Vertreibung aus den Ostgebieten gelangte ich 1945 nach Berlin.
Hier besuchte ich von 1947 bis 1953 die 3. und 9. Grundschule in Berlin-Schöneberg. 1953 wurde ich in die 3. Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges (neusprachliches Realgymnasium) in Berlin-Schöneberg aufgenommen und verließ diese Schule am 7. 3. 1961 nach Ablegung der Reifeprüfung.
Von 1961 bis 1968 studierte ich Veterinärmedizin in Berlin, Gießen und wiederum in Berlin.
Die Tierärztliche Vorprüfung legte ich am 12. 10. 1964 in Berlin (FU) ab. Die Tierärztliche Prüfung bestand ich - ebenfalls in Berlin - am 19. 6. 1968.
Nach meiner sechsmonatigen Praktikantenzeit an der Klinik für Klauentierkrankheiten und Geburtshilfe der FU wurde mir am 9. 2. 1969 die Bestallung als Tierarzt erteilt.
Seit dieser Zeit bin ich als wissenschaftlicher Angestellter an der Abt. Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes in Berlin tätig.